



Edite Reis Cunha

Biocatálise em meios de líquidos iónicos e sua automatização

Tese do 3º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Doutoramento em Ciências
Farmacêuticas na Especialidade de Química Analítica

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Maria Lúcia Marques Ferreira
de Sousa Saraiva e co-orientação da Doutora Paula Cristina de Azevedo Gomes Pinto

Março de 2016

É autorizada a reprodução integral desta tese apenas para efeitos de investigação,
mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Assinatura do autor,

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”

(Aristóteles)

Dedico esta tese
ao Sérgio
à Sara
ao Pedro

Agradecimentos

Ao aproximar-se do final deste longo percurso, é meu desejo deixar uma mensagem de agradecimento a todos aqueles que me incentivaram, e me ajudaram a superar as diversas etapas.

Ao Professor Doutor Costa Lima expresso um agradecimento muito especial por me ter aceite como aluna de doutoramento no Laboratório de Química Aplicada e por todo o incentivo durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Lúcia Saraiva, orientadora científica desta tese, agradeço a confiança, a ajuda sempre presente, os valiosos conselhos científicos, apoio e a sua amizade.

À Doutora Paula Pinto, minha co-orientadora, agradeço todos os ensinamentos transmitidos, todo o entusiasmo e amizade.

À Professora Doutora Salette Reis deixo um agradecimento particular pela simpatia pelo incentivo e amizade, que sempre teve comigo.

Ao Professor Rui Lapa agradeço a simpatia e incentivo para a concretização deste trabalho.

A todos os professores do Laboratório de Química Aplicada, pela simpatia e acolhimento no grupo.

À Marieta por toda a ajuda e contribuição em alguns trabalhos realizados.

À Susana, Sofia e Cláudia. Pela amizade que ultrapassou as fronteiras do Laboratório, e por todos os momentos, bons e menos bons, que vivemos juntas. Vocês serão sempre especiais!

A Ana Marta, pela forma carinhosa que sempre teve comigo, além de todo o apoio e incentivo. Obrigada por tudo amiguinha!

A todos os meus colegas de laboratório, pelo companheirismo e simpático ambiente.

À Cristina, minha amiga de longa data, agradeço a amizade incondicional em todos os momentos. Sei que caminhas sempre ao lado!

À Isabel, pela amizade, força, incentivo e principalmente por continuamente me encorajares em seguir em frente!

Ao Carlos, agradeço, a amizade, a ajuda sempre pronta, ao longo de todos os anos.

À Ana Teixeira, pela alegria sempre constante que sabe, como ninguém, espalhar à sua volta.

À Célia, obrigada pela cumplicidade, pelo ânimo e pela tua amizade.

Ao David, pela ajuda imprescindível na formatação desta tese.

À Manuela e Patrícia todo o apoio e disponibilidade.

Aos meus primos Tiago e Natacha pelas palavras de conforto e incentivo.

Aos meus pais, que não mediram esforços para me ajudar a concretizar este trabalho!

Agradeço o apoio financeiro concedido à Unidade LAQV(UID/QUI/50006/2013-POCI/01/0145/FERDER/007265).



Resumo

Os líquidos iônicos (LIs) têm sido alvo de crescente atenção como solventes alternativos aos meios convencionais em processos biotecnológicos. Com o aumento do interesse nestes compostos várias reações têm sido efetuadas com sucesso, sendo um exemplo disso os procedimentos biocatalíticos. Neste contexto, a avaliação da eficiência e estabilidade das enzimas em meios com LIs assim, como, o conhecimento da toxicidade destes compostos, antes da sua entrada no ambiente, torna-se de primordial importância.

No âmbito deste trabalho foram desenvolvidos procedimentos analíticos baseados na análise por injeção sequencial (SIA), que visavam explorar as potencialidades da associação da biocatálise com as vantagens da automatização. As metodologias apresentadas tiveram como objetivo o desenvolvimento e aplicação de metodologias passíveis de serem utilizadas como alternativas válidas para a avaliação do comportamento dos LIs, com a mais valia de elevada precisão e rapidez em relação aos métodos discretos bem como, reduzido consumo de reagentes e produção de efluentes.

O primeiro trabalho desenvolvido consistiu na implementação de uma metodologia baseada numa reação catalisada pela enzima carboxilesterase, em meio aquoso. A hidrólise da ligação éster do acetato de 4-metil-umbeliferilo, originava um composto fluorescente, 4-metil-umbeliferona. Esta nova metodologia foi aplicada posteriormente na avaliação da atividade da carboxilesterase em meio aquoso e na presença de concentrações crescentes de sete LIs comerciais e bis(p-nitrofenil) fosfato de sódio, um forte inibidor da carboxilesterase. A avaliação da atividade enzimática foi quantificada pela magnitude da diminuição da fluorescência relativamente ao sinal transiente na ausência de amostra. Os resultados mostraram que a carboxilesterase poderá ser um importante biomarcador na avaliação da toxicidade de xenobióticos e em particular dos LIs.

A atividade da enzima α -quimiotripsina em micelas mistas de brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) e concentrações variáveis de LIs foi avaliada através da cinética da reação de hidrólise da N-succinil-fenilalanina-p-nitroanilida (SPpNA). Os parâmetros cinéticos foram calculados e analisados, assim como a concentração micelar crítica e o tamanho médio da micelas, determinados por fluorescência e por ensaios de dispersão dinâmica de luz, respetivamente. Os resultados confirmaram que estes meios reacionais poderão ser alternativas vantajosas aos solventes orgânicos convencionais em biocatálise.

Na metodologia para a avaliação da atividade da aldolase, enzima usada em síntese orgânica, na presença de diferentes LIs e dos solventes orgânicos: dimetilformamida e metanol, utilizou-se uma câmara de mistura associada a uma estratégia de monosegmentação que permitiu melhorar a mistura das soluções envolvidas, assim

como, criar as condições ótimas para o desenvolvimento da reação enzimática envolvida na determinação. A reação consistia em duas etapas: a fragmentação do composto D-frutose-1,6-difosfato (DFDP) que dava origem à di-hidroacetona fosfato (DHAP) e D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P). O aldeído formado reagia com o 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona, na presença de FeCl_3 , dando origem a um composto corado azul. Esta metodologia permitiu avaliar qual o melhor meio reacional para a aldolase.

A avaliação da atividade da glutathione redutase (GR) teve como base uma reação catalisada pela GR, que envolveu a redução da glutathione oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH), na presença de NADPH. A glutathione reduzida reagia com o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico), DTNB, dando origem ao ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) com coloração amarela (412 nm). Nesta metodologia recorreu-se ao procedimento de imobilização da enzima e da diluição em linha dos LIs. A implementação do procedimento de diluição em linha permitiu o alargamento do intervalo de concentrações dos LIs analisados, aumentando o ritmo de amostragem e diminuindo a possibilidade de erros decorrente da preparação de soluções. A associação de um reagente imobilizado com a análise por injeção sequencial, resultou num decréscimo substancial do consumo de reagente e, conseqüentemente, da geração de efluentes. A implementação deste ensaio enzimático na presença de vários LIs resultou em efeitos inibitórios distintos sobre a atividade da enzima, revelando a possibilidade da GR ser também usada como um importante biomarcador em ensaios de toxicidade.

A influência de parâmetros como a concentração e volume dos reagentes, caudal das soluções, assim como o comprimento do tubo reator, na sensibilidade e eficiência dos sistemas SIA, foram estudados e posteriormente selecionada a melhor condição reacional. As metodologias desenvolvidas em SIA mostraram ser robustas, exibindo boa repetibilidade em todas as condições testadas, com RSD entre 5%-7% ($n=10$). Além disso, apresentaram uma redução efetiva de custos atendendo à diminuição de consumo de reagentes assim como uma baixa produção de efluentes (aproximadamente 2 mL por ciclo).

Palavras-chave: líquidos iônicos, meios micelares, biocatálise, toxicidade, análise por injeção sequencial, automatização.

Abstract

Ionic liquids (ILs) are receiving attention as greener alternatives to the organic solvents used as conventional media in biotechnological process. With the increased interest in these compounds several reactions have been carried out with success, being the biocatalytic procedures an example. In this context, the efficiency evaluation and enzyme stability in media with ILs, as well, the knowledge of the toxicity of these compounds before entering in the environment, it's of prime importance. In this work were developed analytical procedures based on sequential injection analysis (SIA), which aimed to explore the association of the potential of biocatalysis with the automation benefits. The presented methodologies aimed to the development and application of methodologies that can be used as valid alternatives for assessing the behavior of ILs, with the added value of high accuracy and speed compared to discrete methods, as well as, reduced reagent consumption and production effluent.

The first work was the implementation of a methodology based on a reaction catalyzed by the ester linkage of ethyl-4-methyl-umbeliferyl, originated a fluorescent compound, 4-methyl-umbeliferone. This new methodology was then applied in the evaluation of carboxylesterase activity in an aqueous medium and in the presence of increasing concentrations of seven commercial ILs and bis (p-nitrophenyl) phosphate sodium, a strong inhibitor of carboxylesterase. The assessment of enzymatic activity was quantified by the magnitude of the decrease in fluorescence relative to the transient signal in the absence of sample. The results show that the carboxylesterase may be an important biomarker of xenobiotics in the evaluation of toxicity and in particular ILs.

The activity of the enzyme α - chymotrypsin in mixed micelles of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and variables concentrations of ILs was evaluated by the kinetics of hydrolysis reaction of the N-succinyl-phenylalanine-p-nitroanilide (SPpNA). The kinetic parameters were calculated and analyzed, as well as the critical micelle concentration and the average size of the micelle, determined by dynamic scattering and fluorescence assays light, respectively. The results confirmed that these reaction media may be advantageous alternatives to conventional organic solvents in biocatalysis.

In the method for evaluating the aldolase activity, an enzyme used in organic synthesis, in the presence of different IL and organic solvents: dimethylformamide and methanol, was used a mixing chamber linked to a monosegmented strategy, that improved the mixing of the solutions involved, as well as to create optimum conditions for the development of the enzymatic reactions involved in the determination. The reaction

consisted of two steps: cleavage of D-fructose-1,6 diphosphate (DFDP), to produce dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and d-glyceraldehyde-3-phosphate (G3P).

The formed aldehyde reacted with 3- methyl -2-benzothiazoline hydrazone in the presence of FeCl_3 , giving rise to a blue colored compound. This methodology allowed to evaluate the best reaction medium for aldolase.

The evaluation of the activity of glutathione reductase (GR) was based on a reaction catalyzed by GR, involving the reduction of oxidized glutathione (GSSG) to the reduced form (GSH) in the presence of NADPH. Reduced glutathione reacted with 5,5'-dithio-bis (2- nitrobenzoic acid) DTNB to give the 2- nitro- 5-thiobenzoic acid (TNB) a yellow derivate (412 nm).

In this methodology appealed to the enzyme immobilization procedure and the dilution line of ILs. The implementation of the dilution procedure allowed on-line extending the range of concentrations of the analyzed ILs, increasing the sampling rate and reducing the possibility of errors arising from the preparation of solutions.

The combination of an immobilized reagent with sequential injection analysis, resulted in a substantial decrease in reagent consumption and, consequently, the generation of waste. The implementation of this enzyme assay in presence of various ILs resulted in different inhibitory effects on the enzyme activity, which suggests the possibility GR also be used as a biomarker important in toxicity testing.

The influence of parameters such as concentration and volume of the reagents, flow rate of the solutions, as well as the reaction coil length, the sensitivity and efficiency of SIA systems have been studied and then the optimum reaction conditions were subsequently selected. The methodologies developed in the SIA proved to be robust, showing good reproducibility for all conditions tested, with RSD of 5%-7% ($n = 10$). Furthermore, they showed an effective reduction of costs in view of the decreased consumption of reagents and a low production of effluent (about 2 ml per cycle).

Keywords: ionic liquids, micellar medium, biocatalysis, toxicity, sequential injection analysis, automation.

Índice

1. CAPÍTULO 1	1
1.1. Métodos automáticos de análise	3
1.1.1. Aspetos gerais da análise em fluxo contínuo não segmentado.....	3
1.1.2. Análise por injeção em fluxo (FIA)	4
1.1.3. Análise por injeção sequencial (SIA).....	8
1.1.4. Análise em fluxo multi-comutado (MCFA)	14
1.1.5. Análise em fluxo por multi-seringa (MSFIA)	17
1.1.6. Análise de fluxo multi-impulsão (MPFS).....	19
1.1.7. Análise em fluxo em sistemas de interface única (SIFA).....	20
1.2. Líquidos Iónicos (LIs)	22
1.2.1. Perspetiva histórica.....	23
1.2.2. Interação de líquidos iónicos com enzimas	26
1.3. Enquadramento geral e objetivos propostos	33
1.4. Referências bibliográficas.....	35
2. CAPÍTULO 2	43
2.1. Aspetos gerais da parte experimental.....	45
2.1.1. Introdução.....	45
2.1.2. Reagentes e soluções	45
2.1.3. Componentes dos sistemas de fluxo	46
2.1.4. Instrumentação	49
2.1.5. Controlo informático dos sistemas	50
2.1.6. Desenvolvimento e otimização das montagens de fluxo	51
2.1.7. Tratamento estatístico dos resultados.....	53
2.2. Referências bibliográficas.....	54
3. CAPÍTULO 3	55

3.1. Avaliação da toxicidade de líquidos iônicos através de um ensaio automatizado de inibição da carboxilesterase humana	57
3.1.1. Introdução	57
3.1.2. Materiais e métodos	59
3.1.3. Resultados e discussão	62
3.1.4. Conclusões	71
3.1.5. Referências bibliográficas	72
4. CAPÍTULO 4	75
4.1. Avaliação da atividade da α-quimiotripsina em micelas mistas de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e líquidos iônicos: estudos cinéticos com recurso à análise por injeção sequencial.....	77
4.1.1. Introdução	77
4.1.2. Materiais e métodos	78
4.1.3. Resultados e discussão	81
4.1.4. Conclusões	90
4.1.5. Referências bibliográficas	91
5. CAPÍTULO 5	95
5.1. Avaliação dos líquidos iônicos como solventes alternativos para a aldolase: utilização de uma nova metodologia automática SIA na avaliação da sua atividade	97
5.1.1. Introdução	97
5.1.2. Materiais e métodos	99
5.1.3. Resultados e discussão	103
5.1.4. Conclusões	113
5.1.5. Referências bibliográficas	114
6. CAPÍTULO 6	119
6.1. Avaliação da toxicidade de líquidos iônicos através de um ensaio automatizado de inibição da atividade da glutatona redutase	121

6.1.1.	Introdução.....	121
6.1.2.	Materiais e métodos.....	124
6.1.3.	Resultados e discussão	127
6.1.4.	Conclusões.....	135
6.1.5.	Referências bibliográficas.....	136
7.	CAPÍTULO 7	139
7.1.	Conclusões gerais	141

Índice de figuras

Figura 1.1 – Representação esquemática de uma montagem FIA. P: dispositivo de propulsão (bomba peristáltica); VI: válvula de injeção; C: ponto de confluência; TR: tubo reator; D: sistema de detecção; E: esgoto; T: solução de transporte; R: solução de reagente; A: amostra.....	5
Figura 1.2 – Representação esquemática dos fenômenos de convecção (I) e de difusão axial (II) e radial (III) num sistema FIA. Adaptado de (1).....	6
Figura 1.3 – Representação esquemática do perfil da amostra imediatamente após a injeção e durante o processo de transporte. A: amostra.....	7
Figura 1.4 – Representação esquemática de uma montagem SIA. P: dispositivo de propulsão; VS: válvula seletora; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reator; D: sistema de detecção; E: esgoto; T: transportador; R: reagente; A: amostra; I: Aspiração sequencial de A e R a partir de VS; II: Sobreposição das zonas que são dirigidas para o detetor; S: zona de sobreposição.	9
Figura 1.5 – Descrição da sobreposição de zonas. La: largura da base da zona de amostra; Ls: largura da base da zona sobreposta; Lr: largura da base da zona de reagente; ID: ponto de isodispersão.	11
Figura 1.6 – Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo por multicomutação. P: dispositivo de propulsão; V: válvula solenóide; TR: tubo reator; D: sistema de detecção; E: esgoto; T: transportador; R ₁ e R ₂ : reagentes; A: amostra.	15
Figura 1.7 – Amostragem binária: (A) a intercalação de pequenos segmentos de amostra (a) e reagente (r) facilita a mistura destas duas soluções durante a fase de transporte (B) e permite uma homogeneização mais rápida da zona de amostra (C).	15
Figura 1.8 – (A) Representação esquemática de uma multi-seringa. VS: válvula solenóide; S: seringas (S1-S4); B: barra condutora dos êmbolos; R: reservatório de solução (B) Direção do fluxo ON: ligado com o sistema; OFF: ligado ao esgoto (C) Representação esquemática do sistema (adaptado de (14)).	17
Figura 1.9 – Representação esquemática de um sistema SIFA. B ₁ e B ₂ : buretas automáticas; V ₁ e V ₂ : válvulas solenóides de duas vias; A: amostra; R: reagente; TR ₁ e TR ₂ : tubos reatores; D: detetor; E: esgoto (adaptado de (6)).	21
Figura 1.10 – Representação da estrutura química de alguns cátions usualmente estudados.	24
Figura 1.11 – Representação da estrutura química de alguns aniões usualmente estudados.	25
Figura 1.12 – Aplicabilidade de LIs por áreas.	26

Figura 1.13 – Alguns dos sistemas biológicos utilizados na avaliação da toxicidade dos LIs. Adaptado de: Pham <i>et al.</i> , 2010, (40).....	30
Figura 2.1 – Fotografia da válvula seletora de fluidos.	47
Figura 2.2 – Representação esquemática de três posições consecutivas da válvula seletora de fluidos.	47
Figura 2.3 – Fotografia da câmara de mistura.....	48
Figura 2.4 – Fotografia do reator enzimático.....	49
Figura 2.5 – Representação do programa de controlo informático do sistema SIA. Sentido (a/b) – sentido de aspiração/propulsão.	51
Figura 3.1 – Reação enzimática envolvida no ensaio de avaliação da actividade da carboxilesterase.....	57
Figura 3.2 – Estrutura química dos LIs estudados. (1) (bmim [BF ₄]), (2) (bmim [Cl]), (3) (emim [TfMs]), (4) (bmpyr [Cl]), (5) (emim [Ms]), (6) (tbph [Ms]), (7) (hmim [Cl]).....	58
Figura 3.3 – Estrutura química do inibidor específico da carboxilesterase. Bis (p-nitrofenil) fosfato de sódio.	59
Figura 3.4 – Figura 3.4. Sistema SIA usado na determinação da atividade da carboxilesterase. T, transportador (Britton-Robinson 0,04 mM, pH 8); BP, bomba peristáltica; VS, válvula seletora de fluídos; TA, tubo de armazenamento (2m); RE, reator; D, detetor.....	60
Figura 3.5 – Diagrama de Pareto com a representação dos efeitos do volume de MUA, volume de enzima e duração do período de paragem (tempo).	63
Figura 3.6 – Superfície de resposta de: (a) volume de enzima (μL) vs. volume de MUA (μL) com ajuste de tempo para 2 minutos, (b) volume de enzima (μL) vs. tempo (minutos) com volume de MUA ajustado para 100 μL e (c) volume de MUA (μL) vs. tempo (minutos) com volume de enzima ajustado para 25 μL.....	64
Figura 3.7 – Estudo do pH na otimização das condições experimentais.....	65
Figura 3.8 – Estudo da temperatura na otimização das condições experimentais.....	66
Figura 3.9 – Curva de calibração obtida com soluções MUA (0,5-5 mmol L ⁻¹).	66
Figura 3.10 – Dados experimentais de toxicidade dos LIs estudados.	69
Figura 4.1 – Sistema SIA usado na determinação da atividade da α-CT. T, transportador (Tris-HCl, pH 7,7); BP, bomba peristáltica; VS, válvula seletora de fluídos; TA, tubo de armazenamento; R, reator; D, detetor; E, esgoto.....	79
Figura 4.2 – Velocidade da reação (ΔUA s ⁻¹) (n=3; RSD <2,5%) obtida com SPpNA 2,5 mM para diferentes intervalos de tempo durante os quais o conteúdo do tubo de armazenamento era enviado para o detetor antes da aquisição do sinal.	83

Figura 4.3 – Representação gráfica da variação da velocidade de reação obtida por aumento da concentração de bmim [Cl], hmim [Cl], bmpy [Cl] e bmpyr [Cl].....	86
Figura 4.4 – Eficiência catalítica da α -CT em micelas mistas de CTAB/LI.	87
Figura 5.1 – Estrutura química dos LIs estudados. 1: metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ms]); 2: trifluorometanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [TfMs]); 3: tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [BF ₄]); 4: acetato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ac]); 5: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [Cl]); 6: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [BF ₄]); 7: cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio (hmim [Cl]); 8: acetato de colina (chol [Ac]); 9: cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio (bmpyr [Cl]).	100
Figura 5.2 – Sistema SIA usado na determinação da atividade da aldolase. T, transportador (MOPS 25 mM, pH 7); BP, bomba peristáltica; VS, válvula seletora de fluídos; TA, tubo de armazenamento (2m); CM, câmara de mistura; AM, agitador magnético; D, detetor; E, esgoto.	101
Figura 5.3 – Representação esquemática da reação espectrofotométrica da determinação do aldeído formado pela degradação do DFDP pela aldolase. A: MBTH (3-metil-2-benzotiazolona hidrazona); B: G3P (D-gliceraldeído-3-fosfato); C: Azida; D: corante tetrazopentametincianina; E: composto azul formazana.	106
Figura 5.4 – Sinais analíticos obtidos durante a avaliação da atividade da aldolase (DFDP 7-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e inibição do bmpyr [Cl] (5-50%).	107
Figura 5.5 – Resultados da atividade da aldolase em solventes orgânicos e LI (expressos como percentagem de inibição).	109
Figura 5.6 – Atividade da aldolase na presença de bmim [Cl], hmim [Cl] e solventes orgânicos.	111
Figura 5.7 – Actividade da aldolase na presença de emim [Ms], emim [TfMS], emim [Ac], emim [BF ₄] e solventes orgânicos.	112
Figura 6.1 – Ensaio de regeneração DTNB-glutationa reductase.	122
Figura 6.2 – Estrutura química dos compostos estudados. 1: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [BF ₄]); 2: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [Cl]); 3: metanosulfonato de tetrabutílfosfônio (tbph [MS]); 4: cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio (bmpyr [Cl]); 5: tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [BF ₄]); 6: trifluorometanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [TfMs]); 7: metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ms]).	123
Figura 6.3 – Sistema SIA usado na determinação da atividade da glutatona. T, transportador; BP, bomba peristáltica; VS, válvula seletora de fluídos; TD, tubo de diluição, TA, tubo de armazenamento (2m); RE, reator enzimático; D, detetor, E, esgoto.	126

Figura 6.4 – Efeito dos diferentes volumes de GSSG, NADPH e DTNB no sinal obtido: (soluções de GSSG 0,8 μ M).	129
Figura 6.5 – Efeito de diferentes concentrações de NADH e DTNB no sinal obtido (solução padrão de GSSG 0,8 μ M).	129
Figura 6.6 – Sinais analíticos e respectivos fatores de diluição, obtidos pela transferência, em ciclos analíticos consecutivos de volumes de análise (V_A) de 12,5 μ L (a) ou 25 μ L (b) para o tubo de armazenamento. Fator de diluição: nível de diluição obtido através do cálculo entre a razão dos sinais obtidos com e sem diluição.....	131
Figura 6.7 – Resultados dos ensaios de inibição enzimática.	132

Índice de tabelas

Tabela 3.1 – Protocolo analítico para a determinação da atividade da carboxilesterase .	61
Tabela 3.2 – Toxicidade dos inibidores estudados expressa como EC ₅₀ .	68
Tabela 4.1 – Protocolo analítico para o estudo da atividade da α -CT	80
Tabela 4.2 – Resultados da otimização dos ensaios cinéticos da α -CT no sistema SIA.	82
Tabela 4.3 – Efeito dos LI nas características das micelas de CTAB	85
Tabela 4.4 – Parâmetros cinéticos da α -CT em micelas mistas de CTAB/hmim [Cl].	87
Tabela 4.5 – Parâmetros cinéticos da α -CT em micelas mistas de CTAB/bmim [Cl].	88
Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos da α -CT em micelas mistas de CTAB/bmpyr [Cl].	88
Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos da α -CT em micelas mistas de CTAB/bmpyr [Cl].	88
Tabela 5.1 – Procedimento analítico para o estudo da atividade da aldolase.	103
Tabela 5.2 – Declive das correlações lineares obtidas durante o estudo da atividade da aldolase em DMF, metanol e LIs (5,20 e 50%).	108
Tabela 6.1 – Protocolo analítico para a determinação da atividade da glutationala.	127
Tabela 6.2 – Intervalo dos valores estudados nos ensaios de otimização e valores selecionados para os ensaios finais.	128
Tabela 6.3 – Toxicidade dos inibidores estudados expressa como EC ₅₀ .	133

Abreviaturas

AGB	Esferas de vidro alquilaminado
bmim [BF ₄]	Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio
bmim [Cl]	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio
bmpyr [Cl]	Cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio
BNPN	Bis (p-nitrofenil) fosfato de sódio
BP	Bomba peristáltica
CE	Carboxilesterase
chol [Ac]	Acetato de colina
CM	Câmara de mistura
α -CT	α -Quimiotripsina
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamónio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR	Desvio relativo
EC ₅₀	Concentração do composto que induz metade do efeito máximo
emim [Ac]	Acetato de 1-etil-3-metilimidazólio
emim [BF ₄]	Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio
emim [Ms]	Metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio
emim [TfMs]	Trifluorometanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio
FIA	Análise por injeção em fluxo
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
hmim [Cl]	cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio
K _{cat}	Constante catalítica
K _m ^{ap}	Constante de Michaelis-Menten aparente
LD	Limite de deteção
LI	Líquidos iónicos
LOV	"lab-on-valve", sistema de análise por injeção sequencial miniaturizado
LQ	Limite de quantificação
MBTH	3-metil-2-benzotiazolina hidrazona
MCFA	Análise em fluxo multi-comutado
MPFS	Análise de fluxo multi-implusão
MUA	4-metil-umbeliferona

MSFIA	Análise em fluxo por multi-seringa
NADPH	β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTFE	Politetraflouroetileno
PVC	Cloreto de polivinilo
RSD	Desvio padrão relativo
RSM	Metodologia de superfície de resposta
SIA	Análise por injeção sequencial
SIFA	Análise em fluxo de interface única
p-NA	p-Nitroanilida
SPpNA	N-succinil-fenilalanina-p-nitroanilida
$S_{y/x}$	Estimativa do desvio padrão da distribuição normal dos pontos da curva de calibração usada, segundo o método dos mínimos quadrados
TA	Tubo de armazenamento
tbph [Ms]	Metanosulfonato de tetrabutílfosfónio
TD	Tubo de diluição
u.a.	Unidades arbitrárias
U.A.	Unidades de absorvância
V_{\max}^{ap}	Velocidade de reação máxima aparente
VOCs	Compostos orgânicos voláteis
VS	Válvula seletora de fluídos

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1.1. Métodos automáticos de análise

A Química Analítica é uma área multifacetada cujo objetivo fundamental consiste em obter informação relativa às amostras, no sentido de caracterizar qualquer tipo de material, quer ao nível da sua identificação como ao nível da quantificação. Esta procura de conhecimento tem expandido a necessidade de uma melhoria nos métodos de análise, de modo a oferecerem a possibilidade de processamento de um elevado número de amostras, de uma forma rápida e eficaz, com elevada seletividade, precisão, exatidão e irem ao encontro de economia de recursos e intervenção humana. Tudo isto, terá dado lugar ao desenvolvimento da automatização e como resultado um avanço e uma melhoria das técnicas analíticas, em geral.

O aumento da importância e consequente utilização deste tipo de métodos tem sido particularmente significativo em áreas como a análise clínica, ambiental, química, biomédica, farmacêutica e também análise alimentar.

Nas últimas décadas, têm sido visíveis alterações bastante significativas na instrumentação e automatização analítica, que, atualmente, são capazes de fornecer informações de forma contínua, em tempo real, o que facilita o controlo dos processos e, simultaneamente, têm um menor impacto ambiental.

1.1.1. Aspetos gerais da análise em fluxo contínuo não segmentado

Os métodos de fluxo contínuo são métodos automáticos de análise em que a determinação da concentração da espécie a analisar é realizada sem interrupções sobre um fluxo líquido ou gasoso (1).

Nestes sistemas, as amostras a analisar são sucessivamente introduzidas numa tubagem preenchida com uma solução (solução transportadora) que pode conter um reagente que se deseje adicionar à amostra, ou alternativamente, um ou mais reagentes poderão ser introduzidos em fases posteriores através de condutas auxiliares e de confluências. O fluxo é encaminhado para um sistema de deteção que produz um sinal analítico contínuo, originando cada amostra um sinal transitório em forma de curva, que é registado convenientemente por um dado instrumento.

Nestes métodos podem ainda associar-se sistemas intermédios durante o percurso, os quais permitam a realização de diversas operações adicionais, tais como aquecimento, diálise, extração líquido-líquido, entre outras.

Os métodos de fluxo contínuo são os métodos automáticos de análise mais utilizados para a implementação de processos analíticos, este facto deve-se, principalmente aos baixos custos de instalação e operação, bem como à elevada versatilidade, facilidade de operação e controlo. Além disso, apresentam reduzido consumo de amostras, reagentes e tempo de análise.

As potencialidades dos métodos de fluxo contínuo têm sido evidenciadas pelo crescente número de trabalhos científicos publicados, incidindo estes na análise por injeção em fluxo, embora nos últimos tempos tem-se assistido ao aparecimento de novas técnicas de gestão de fluidos e à utilização das mesmas nas mais diversas áreas, tais como a análise por injeção sequencial (2), a análise por fluxo multi-comutado (3), a análise por injeção em fluxo baseada em multi-seringa (4), a análise em sistemas de fluxo multi-impulsão (5) e, mais recentemente, a análise em sistemas de fluxo de interface única (6).

1.1.2. Análise por injeção em fluxo (FIA)

A análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “Flow Injection Analysis”) surgiu face à necessidade de automatizar métodos de análise de rotina que exigiam uma elevada frequência de amostragem (7).

A técnica FIA é uma metodologia cinética de tempo fixo que se baseia na utilização da informação inerente ao gradiente de concentrações que gera dispersão física do segmento de amostra no fluido transportador não segmentado e por reação química do analito com uma ou mais constituintes do fluido transportador, se for caso disso. O instrumento de medida deteta a espécie formada, gerando um sinal transiente cuja forma e magnitude fornece informação, quer da concentração do analito na amostra intercalada, quer da cinética das reações químicas que decorrem em fluxo.

De referir que o fluxo transportador para além de apresentar um movimento contínuo, apresenta simultaneamente características de um fluxo laminar (8, 9).

Durante o percurso para a deteção a amostra pode reagir com a solução transportadora, ou pela adição, através de confluências, de diferentes soluções com reagentes específicos que dão origem a determinadas reações químicas (Figura 1.1).

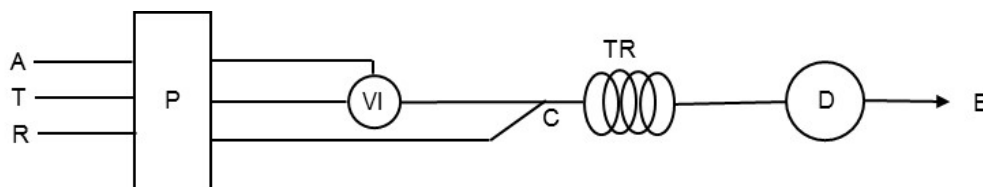


Figura 1.1 – Representação esquemática de uma montagem FIA. P: dispositivo de propulsão (bomba peristáltica); VI: válvula de injeção; C: ponto de confluência; TR: tubo reator; D: sistema de detecção; E: esgoto; T: solução de transportador; R: solução de reagente; A: amostra.

De uma forma resumida, e com base na descrição da metodologia FIA, as principais características da técnica são:

- i) O fluxo não é segmentado por bolhas de ar, sendo esta a diferença fundamental com os métodos em contínuo.
- ii) A amostra é injetada diretamente no fluxo em lugar de ser aspirada.
- iii) A amostra é transportada pelo fluxo ao longo de todo o sistema e, durante esse trajeto podem ocorrer outros processos físico-químicos.
- iv) A dispersão parcial ou diluição do analito, durante toda a operação de transporte, pode ser manipulada mediante o controlo das características geométricas e hidrodinâmicas do sistema.
- v) O sistema é sensível a alguma propriedade do analito, a qual se deteta de forma contínua, produzindo um sinal transitório que é convenientemente registado.
- vi) Quando o sinal é detetado, não se atingiu nem o equilíbrio físico (para o qual seria necessário a homogeneização de uma parte dos líquidos) nem o equilíbrio químico (a reação é incompleta).
- vii) O tempo operacional deve ser altamente reprodutível, pois as medições ocorrem sob condições não estáveis e pequenas variações dão origem a sérias alterações nos resultados.

À medida que o segmento da amostra se movimenta no sistema, gera-se um gradiente de concentrações, obtido por reação química ou dispersão física, baseando-se a metodologia no controlo da dispersão da amostra intercalada no fluxo transportador. O gradiente de concentrações é monitorizado num dispositivo detetor sendo a forma do sinal obtido dependente, entre outros, do percurso entre o local da injeção e o sistema detetor. A dispersão do segmento de amostra depende do volume de amostra, do comprimento do reator e do tempo de residência, que é o tempo que a amostra se mantém dentro da

tubagem (tempo que decorre entre o momento de injeção e o aparecimento do máximo do sinal analítico, correspondente a essa amostra), nas mesmas condições temporais e espaciais (8).

A dispersão do segmento de amostra é conseguida segundo dois mecanismos: o transporte por convecção e o transporte por difusão (radial e axial) que acontece dada a ocorrência de gradientes de concentração nos diversos instantes do transporte por convecção (Figura 1.2) (1).

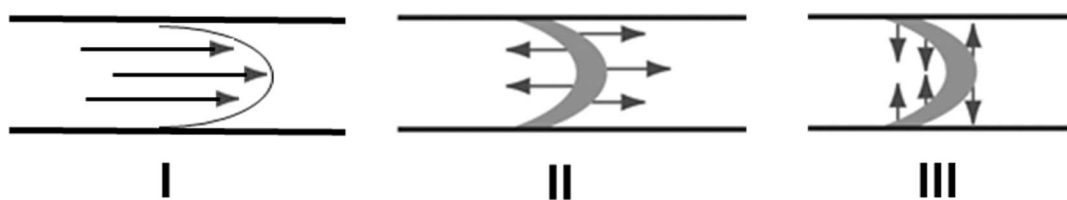


Figura 1.2 – Representação esquemática dos fenómenos de convecção (I) e de difusão axial (II) e radial (III) num sistema FIA. Adaptado de (1).

No instante imediato à injeção do segmento de amostra, forma-se uma zona de amostra de perfil retangular. Esta zona sofre um alargamento, à medida que ocorre o processo de transporte, consequência da dispersão do segmento de amostra no fluxo transportador, com progressiva formação de um perfil parabólico (Figura 1.3).

Ao longo do percurso entre a injeção da amostra e o detetor, é possível verificar que numa fase inicial predomina o transporte por convecção em que se obtém um perfil parabólico devido ao facto de as moléculas junto à parede da tubagem apresentarem uma velocidade virtualmente nula e as moléculas que se movem, no centro da tubagem apresentarem uma velocidade que corresponde ao dobro da velocidade média. O transporte por difusão radial e axial verifica-se devido à formação de gradientes de concentração durante o transporte por convecção. A difusão radial contribui para a eficiente mistura entre a zona de amostra e o reagente ao longo do percurso analítico, movimentando as partículas adjacentes às paredes do tubo para o centro e vice-versa, impedindo a sobreposição de amostras adjacentes, contrariando o efeito provocado pela dispersão por convecção e preservando a identidade da amostra (1).

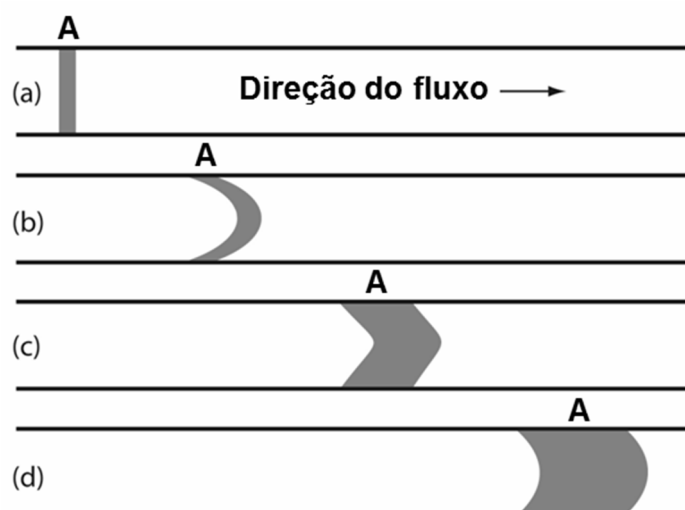


Figura 1.3 – Representação esquemática do perfil da amostra imediatamente após a injeção e durante o processo de transporte. A: amostra.

É possível falar em reprodutibilidade das determinações analíticas quando a extensão da dispersão e o tempo de reação, assim como os parâmetros físicos do sistema, forem constantes durante o processo de transporte.

O processo é muito versátil dado que é possível manipular o tempo de reação entre a amostra e o reagente, recorrendo ao método de paragem de fluxo ou à alteração do caudal e/ou das dimensões do reator (8, 10).

A análise por injeção em fluxo em regime laminar reduz o perigo da mistura de amostras pelo que não é necessária a introdução de bolhas de ar, que tornam o equipamento mais complexo dificultando a miniaturização. As montagens FIA apresentam uma configuração simples e económica, oferecendo grande versatilidade e flexibilidade em várias determinações analíticas já que utilizam equipamento de uso comum nos laboratórios de Química (2, 11).

Estas vantagens associadas ao facto de uma análise num sistema FIA requerer pequenos volumes de amostra (na ordem de 10-100 μL), apresentar elevado ritmo de amostragem (cerca de 120 determinações por hora), elevada reprodutibilidade, reduzidos tempos de resposta e permitir que a leitura do sinal analítico se efetue sem que a reação química alcance as condições de equilíbrio físico e químico, evidenciam a ampla utilização desta metodologia na implementação e automatização de procedimentos analíticos nas mais diversas áreas (10).

Apesar das potencialidades em termos de flexibilidade, reprodutibilidade, fiabilidade e facilidade de utilização, pode-se contudo apontar-lhe algumas desvantagens importantes

quando se considera a sua utilização em laboratórios de controlo e rotina. A impulsão contínua das soluções implica um consumo elevado de soluções, particularmente de soluções de transporte. Por outro lado, a presença de um canal para cada solução pode, dependendo da determinação em causa, complicar as montagens. A técnica preserva baixa autonomia relativamente ao operador, uma vez que necessita de reconfiguração física para cada determinação. Os sistemas são por norma sistemas com carácter monoparamétrico, onde por vezes é notória a dificuldade de adaptação quando a variação da composição da matriz e de concentração das espécies monitorizadas ao longo de um processo é considerável.

1.1.3. Análise por injeção sequencial (SIA)

1.1.3.1. Fundamentos e características

A análise por injeção sequencial (SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”) foi introduzida em 1990, por J. Ruzicka e G. Marshall como forma de implementação de sistemas mais versáteis, robustos, fiáveis e flexíveis, que impliquem baixa manutenção e não envolvam reconfiguração na montagem de fluxo (2).

A metodologia SIA mantém os mesmos princípios da metodologia FIA no que diz respeito à precisão na introdução da amostra, controlo da dispersão e manipulação reprodutível da amostra (12, 13). Inicialmente, ocorre a aspiração sequencial de volumes rigorosos de amostra e de reagente para um tubo de armazenamento (“holding coil”). A aspiração das soluções é efetuada a partir de uma válvula seletora e através da escolha do canal correspondente. Através da inversão do sentido do fluxo, e por comutação da válvula seletora, ocorre a sobreposição reprodutível das zonas de amostra e reagente, para a qual contribuem os processos de transporte convencional e de difusão molecular.

1.1.3.2. Componentes da montagem

O funcionamento da montagem SIA é controlado por computador, possibilitando desta forma que o dispositivo de propulsão e a válvula seletora funcionem de modo sincronizado, sendo possível definir parâmetros como o volume, o sentido e velocidade de

escoamento das diferentes soluções, tempo de residência e ordem de introdução dos reagentes, entre outros.

Uma montagem SIA (Figura 1.4) apresenta semelhanças com uma montagem FIA diferindo, no entanto, ao nível do sistema de injeção da amostra e introdução de reagentes, que nos sistemas SIA é uma válvula seletora de fluidos multiposição. Estas válvulas possuem uma porta central com ligação a várias portas laterais (conectando com uma de cada vez) e a um dispositivo de propulsão. A localização do dispositivo de propulsão possibilita o acesso ao tubo reator de armazenamento, aos reagentes, à amostra, ao detetor e a outros dispositivos adicionais, com ligação a cada uma das portas laterais.

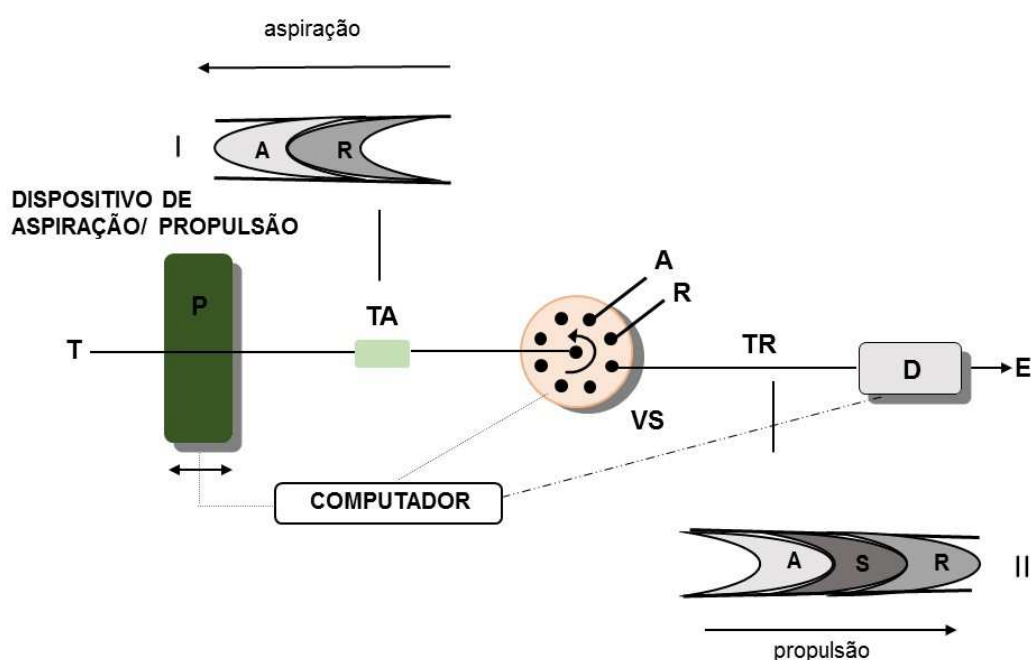


Figura 1.4 – Representação esquemática de uma montagem SIA. P: dispositivo de propulsão; VS: válvula seletora; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reator; D: sistema de deteção; E: esgoto; T: transportador; R: reagente; A: amostra; I: Aspiração sequencial de A e R a partir de VS; II: Sobreposição das zonas que são dirigidas para o detetor; S: zona de sobreposição.

A aspiração sequencial de amostra e reagente(s) cria uma zona com segmentos adjacentes de diferentes soluções (Figura 1.4-I). A dispersão que ocorre nesta zona deve-se ao transporte por convecção, que ocorre com o escoamento, e ao processo de difusão molecular nas interfaces das zonas adjacentes. Sendo o escoamento predominantemente laminar, inicialmente um segmento de amostra inserido no sistema fica sujeito a um perfil

parabólico de velocidades devido à formação de gradientes de concentração responsáveis pela difusão radial e axial. Depois de se efetuar a aspiração de todas as soluções para o tubo de armazenamento e quando é invertido o sentido de rotação do dispositivo de propulsão, ocorre inversão do sentido do fluxo (Figura 1.4-II), diminuição da dispersão axial dos segmentos e sobreposição reproduzível das zonas de amostra e reagente (14-16). Cria-se uma zona composta resultante da penetração mútua dos segmentos que é encaminhada para o detetor onde é monitorizada, resultando um sinal analítico cuja magnitude é proporcional à concentração da espécie a analisar.

1.1.3.3. Dispersão e sobreposição das zonas

Um aspeto de relevo desta metodologia prende-se assim com o facto de a inversão do sentido de fluxo, associado ao seu modo de funcionamento, permitir a obtenção de diferentes graus de mistura entre as zonas envolvidas, ocorrendo variação do percurso a efetuar dentro do sistema através de inversões sucessivas do fluxo (14-16). Deste modo, enquanto que em FIA o tempo de residência é fixado pelo comprimento do reator e pelo caudal, em SIA este tempo é definido à custa do programa informático, o qual é capaz de fixar o escoamento num dado sentido bem como proporcionar paragem e inversão do sentido do fluxo, garantindo aspirações e propulsões reproduzíveis sem que seja necessário alterar a configuração da montagem analítica (13).

Os volumes em SIA são definidos à custa do caudal e do tempo de aspiração ou propulsão. Tal como acontece em FIA, os parâmetros referentes ao sistema SIA e aos reagentes envolvidos na determinação analítica devem ser otimizados de forma a promoverem o grau de dispersão ideal para a determinação em causa (17).

Apesar da metodologia SIA possuir características que facultam a implementação de procedimentos analíticos complexos sem reconfiguração física do sistema, como já foi mencionado, e de oferecer a possibilidade de aspirar sequencialmente um maior número de reagentes, apresenta uma restrição quanto ao número de zonas que podem ser misturadas por inversão de fluxo, no reator. Um dos requisitos para a metodologia SIA ser bem sucedida consiste em alcançar a máxima penetração de zonas provocada pelo aumento da dispersão radial obtida pela inversão do sentido de fluxo (9, 16). Contudo, a sobreposição de zonas de amostra e reagentes, mesmo após a inversão do sentido, é apenas parcial, como se observa na Figura 1.5.

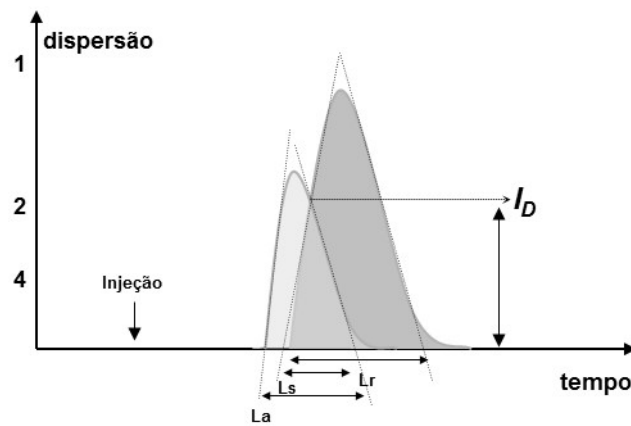


Figura 1.5 – Descrição da sobreposição de zonas. La: largura da base da zona de amostra; Ls: largura da base da zona sobreposta; Lr: largura da base da zona de reagente; ID: ponto de isodispersão.

Atendendo a que o número de zonas que pode ser misturado por inversão do fluxo constitui uma limitação desta técnica, para fazer a rentabilização máxima de uma montagem SIA, é fundamental fazer um estudo de sobreposição de zonas, o que justificou o aparecimento de um parâmetro designado por grau de sobreposição (P), o qual corresponde ao intervalo de tempo em que é possível obter uma medida significativa com base na altura ou área do pico (15, 16). O grau de penetração (16) é definido como:

$$P = \frac{2Ls}{(La + Lr)}$$

Na equação anterior Ls corresponde à largura da base do pico da zona sobreposta e La e Lr correspondem, respetivamente, à largura das bases dos picos de amostra e reagente respetivamente. O valor de P varia entre 0 e 1 e, tal como se pode depreender, uma sobreposição total de zonas de amostra e reagente corresponde a um valor de $P = 1$, enquanto a ausência de sobreposição origina um valor de $P = 0$. Na ausência de sobreposição completa, como habitualmente acontece, observa-se um ponto de isodispersão (I_D), no qual os coeficientes de dispersão da amostra e dos reagentes são idênticos, e deste modo a razão das concentrações é igual à das soluções puras antes de serem injetadas no sistema.

Num sistema SIA, o valor de P está diretamente relacionado com a dispersão sofrida por cada uma das zonas aspiradas, no interior do sistema. A primeira solução a ser

aspirada sofre uma dispersão superior à segunda solução, estando, assim, o grau de penetração dependente da ordem de aspiração. Outros fatores que influenciam este parâmetro são a relação de volumes das soluções, os caudais e o diâmetro e comprimento dos tubos usados na montagem (16).

A inversão do sentido do escoamento, inerente ao modo de funcionamento do SIA, permite obter diferentes graus de mistura entre as zonas envolvidas, sem aumentar o seu percurso no interior do sistema. Enquanto que a extensão deste percurso afeta predominantemente a dispersão, é o número de vezes em que se verifica a inversão de sentido que determina a maior ou menor sobreposição de zonas. Contudo, segundo Guebeli *et al.* (16) a forma mais efetiva de promover a sobreposição de zonas será com a primeira inversão de sentido e com o seu comprimento, devendo a opção das inversões de sentido múltiplas ser relegada apenas para os casos em que a mistura seja difícil (ex: diferentes viscosidades).

Já no que concerne ao efeito do diâmetro dos tubos usados, geometria do reator e caudais aplicados, foi verificado (18) que os tubos com 0,5 mm de diâmetro interno eram desfavoráveis na situação de aspiração de líquidos dado originarem pressões negativas, com eventual formação de bolhas, e consequente diminuição de reprodutibilidade. Relativamente aos tubos com 1,5 mm de diâmetro interno a sua utilização apenas é indicada para tubo de armazenamento pois, a diminuição da dispersão axial no seu interior conduz a uma menor sobreposição de zonas com registo de picos mais estreitos. Já um aumento da sobreposição é obtido quando a tubagem apresenta uma geometria linear pelo menos numa primeira fase de mistura.

No que concerne ao caudal aplicado, não é possível manipulá-lo tendo apenas em conta a sobreposição de zonas. De facto, fatores tão importantes como reprodutibilidade nos volumes aspirados e ausência de sobrepressões, obriga a ponderar sobre as escolhas a efetuar.

Apesar do parâmetro $S_{1/2}$ ter sido introduzido por Ruzicka e Hansen em 1988 em considerações teóricas sobre FIA, ele pode ser aplicado a estudos de penetração de zonas e dispersão durante a otimização de um sistema SIA. $S_{1/2}$ é definido como o volume de solução que origina um sinal analítico com uma intensidade 50% inferior ao obtido com a mesma solução, na ausência de qualquer diluição, e é específico de cada montagem e modo de operação. O cálculo deste valor é feito após a aspiração de volumes crescentes de uma solução corada, interpolando o volume correspondente a metade da intensidade da solução não diluída. Os estudos efetuados por Guebeli *et al.* no que se refere ao cálculo do $S_{1/2}$ basearam-se somente nos fenómenos de dispersão física, desprezando a reação química ou a sua cinética. Em 1996, Cladera *et al.* avaliaram o efeito dos caudais e das

dimensões da tubagem, tendo concluído que o valor de $S_{1/2}$ aumentava sempre que as alterações conduzem a um aumento de tempo de residência das soluções no sistema.

A elevada versatilidade da metodologia SIA quando comparada com a metodologia FIA, associada à eficiente utilização das soluções, reduzido consumo de amostras e reagentes e consequente diminuição de resíduos para além da inerente compactação dos equipamentos constituem as principais vantagens da técnica SIA (2, 16, 19). Há ainda a acrescentar que a versatilidade da válvula seletora multiposição juntamente com o uso do computador oferecem uma grande flexibilidade ao sistema, uma vez que se podem programar muitas operações que mimetizam os sistemas manuais, realizando-as em linha sem grandes dificuldades. Esta metodologia permite acoplar num mesmo sistema mais do que um dispositivo de seleção, multiplicando, desta forma, o número de operações a realizar.

No entanto, a metodologia SIA apresenta alguns aspetos menos favoráveis frequentemente referidos na literatura. O ritmo de amostragem é mais baixo do que na técnica FIA, facto que se deve ao tempo gasto para que a válvula seletora multiposição efetue a comutação entre as diferentes portas laterais e também, devido às soluções terem que ser previamente aspiradas para um tubo de armazenamento ocorrendo, eventualmente, posterior inversão do movimento dos fluidos dentro deste tubo. Existem limitações no que concerne à extensão da mistura entre amostra e reagente, uma vez que a junção dos segmentos destas soluções acontece necessariamente “topo a topo”, sendo mais difícil a sobreposição das zonas de amostra e reagentes adjacentes. Esta metodologia exige, também, equipamento de custo mais elevado (20).

1.1.3.4. Lab-on-valve (LOV)

A procura constante pela miniaturização e compactação dos sistemas de análise em fluxo fez surgir em 2000, por J. Ruzicka, os módulos de análise do tipo “Lab-on-valve” (LOV), os quais são baseados no mesmo princípio de funcionamento dos sistemas SIA, embora correspondam a uma versão miniaturizada dos mesmos. A miniaturização é conseguida através da conceção de uma estrutura designada por unidade central de processamento da amostra (CSPU do inglês “central sample processing unit”), cujo componente principal é uma válvula seletora multiposição de uma montagem SIA (19).

Os módulos de análise tipo LOV são desenhados de forma a possibilitar diferentes manipulações da amostra (diluição, adição de reagentes, mistura, incubação, separação) e até mesmo a deteção (19, 21).

A miniaturização e compactação do equipamento, o controlo informático de todos os passos do procedimento experimental, a integração de todos os componentes da montagem numa estrutura rígida, reforçando a repetibilidade das operações de processamento das amostras, para além da forte redução do consumo de amostra e reagentes, importantíssimo quando se está na presença de pequenas quantidades de amostra e reagentes ou quando os reagentes possuem custo elevado, apresentam-se como as verdadeiras vantagens dos módulos LOV (19).

1.1.4. Análise em fluxo multi-comutado (MCFA)

A crescente necessidade de sistemas de fluxo caracterizados por elevada flexibilidade, facilidade de operação e versatilidade, levou ao aparecimento de uma nova metodologia designada por multicomutação. A multicomutação foi descrita pela primeira vez em 1994 por Reis *et al.* (22) e tem como base de funcionamento a utilização de dispositivos de comutação individuais como dispositivos injetores. Tais dispositivos correspondem a válvulas solenóides de três vias (válvulas eletromecânicas ativadas por um solenóide), sendo cada válvula acionada individualmente. Esta característica permite a utilização combinada de várias válvulas solenóides, dispostas em distintas topologias, de modo a criar uma rede de fluxo consistindo em diferentes percursos analíticos, possibilitando uma grande versatilidade na manipulação da zona de amostra, sem necessidade de introduzir alterações na configuração da montagem analítica.

A introdução da amostra e reagentes no percurso analítico pode ser efetuada por aspiração para um único canal, colocando o sistema de propulsão após o sistema de deteção (Figura 1.6) e selecionando as posições das respetivas válvulas. A introdução das soluções na rede de fluxo pode também ser efetuada colocando o sistema de propulsão antes das válvulas de comutação, portanto numa estratégia de impulsão de soluções (23), contribuindo para a redução do aparecimento de bolhas de ar no sistema, devido à pressão positiva. Contudo, neste tipo de configuração a complexidade do sistema aumenta devido à necessidade de utilizar um canal para cada solução de amostra e reagente e, consequentemente, o custo do equipamento envolvido também se torna mais elevado. Este facto é ultrapassado utilizando bombas peristálticas multicanal, as quais permitem a recirculação das soluções diminuindo o seu consumo.

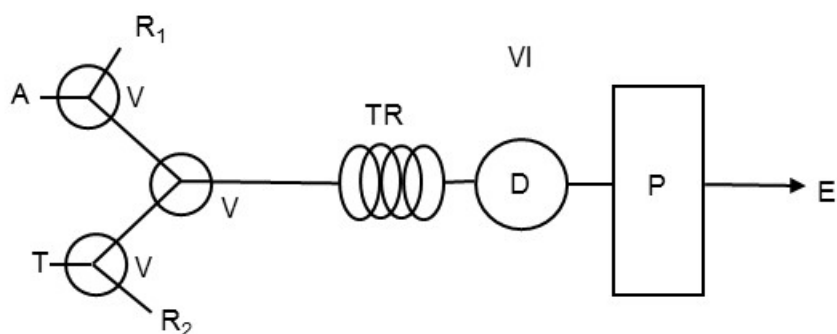


Figura 1.6 – Representação esquemática de um sistema de análise em fluxo por multicomutação. P: dispositivo de propulsão; V: válvula solenóide; TR: tubo reator; D: sistema de detecção; E: esgoto; T: transportador; R₁ e R₂: reagentes; A: amostra.

A multicomutação permitiu a introdução de um novo conceito de gestão de fluidos denominado de amostragem binária (Figura 1.7) (22, 24, 25), principal potencialidade desta metodologia. Este conceito, baseia-se na inserção sequencial de pequenas alíquotas de amostra (na ordem dos μL) intercaladas com pequenas alíquotas de reagente no percurso analítico, formando a partir do ponto de inserção uma sequência binária. Esta estratégia de gestão de fluidos só é exequível devido à elevada rapidez de comutação entre as posições da válvula.

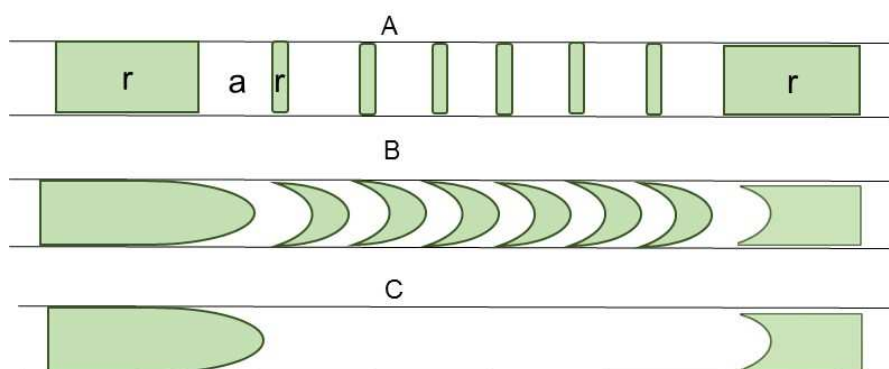


Figura 1.7 – Amostragem binária: (A) a intercalação de pequenos segmentos de amostra (a) e reagente (r) facilita a mistura destas duas soluções durante a fase de transporte (B) e permite uma homogeneização mais rápida da zona de amostra (C).

Assim, os segmentos adjacentes misturam-se rapidamente enquanto são transportados através do tubo reator, ocorrendo dispersão das interfaces e rápida

homogeneização da mistura, o que favorece o desenvolvimento de reações químicas (22). As claras vantagens desta estratégia de gestão de fluidos são a mais eficiente homogeneização da zona de amostra com menor dispersão e, ainda, o aumento da velocidade de formação do produto, já que a mistura das soluções tem início na fase de amostragem (25, 26) aumentando, desta forma, o ritmo de amostragem.

À medida que se aumenta o número de segmentos de alíquotas, para o mesmo volume de amostra e reagente, aumenta-se o número de zonas de contacto entre soluções e, consequentemente, melhora-se a mistura entre elas. De realçar que se obtém uma mistura mais eficaz, para um volume total de amostras e reagentes constante, quando se diminui o volume das alíquotas de amostra e reagente inseridas e se aumenta o número de segmentos intercalados.

O perfil de dispersão alcançado pela mistura amostra/reagente, usando um sistema multicomutado, se por um lado contribui para a otimização da mistura entre as soluções, aumentado a sensibilidade, por outro causa diluição originando alargamento do sinal analítico e reduzindo o ritmo de amostragem. Consequentemente ter-se-á que optar por uma situação de compromisso mediante os objetivos desejados (maior sensibilidade vs maior ritmo de amostragem).

As montagens MCFA são vistas como sistemas económicos na medida em que integram equipamento de baixo custo, de simples implementação e possibilidade de miniaturização. Além disso, o consumo de amostra e reagente é reduzido uma vez que a inserção do volume de amostra e reagente é controlada pelos tempos de inserção, de forma muito precisa (24). A reprodutibilidade e automação são valorizadas uma vez que as válvulas solenóides requerem intervenção mínima por parte do operador, sendo o processo controlado por computador de forma reprodutível. Este facto reflete-se na redução dos tempos de análise, superando a metodologia SIA (2), e no aumento do número de determinações por hora (14).

Apesar das vantagens referidas, a multicomutação apresenta algumas desvantagens, que estão fundamentalmente associadas com as características operacionais das válvulas solenóides, nomeadamente uma inferior robustez. A ativação de uma válvula solenoide durante um período de tempo prolongado leva a um aquecimento da válvula, o que pode conduzir à deformação do teflon das membranas internas, causando assim a sua inutilização (14).

1.1.5. Análise em fluxo por multi-seringa (MSFIA)

A análise por injeção em fluxo baseada em multi-seringa (MSFIA, do inglês “Multisyringe Flow Injection Analysis”) foi descrita pela primeira vez por Cerdà *et al.* em 1999 (10). Caracteriza-se pela utilização solidária de um conjunto de seringas como dispositivo de propulsão.

Esta metodologia foi desenvolvida com base na utilização de uma bureta automática que é uma bomba de pistão multicanal com quatro seringas, que podem ter capacidades diferentes. As quatro seringas estão ligadas em bloco a um único motor de uma bureta automática convencional, que pode ser controlada por um computador (Figura 1.8). À saída de cada seringa existe acoplada uma válvula solenóide de três vias com a função de ligar a seringa ao sistema de fluxo ou ao reservatório da solução que retém, gerindo as soluções para que não sejam introduzidas no percurso analítico simultaneamente (27). Este facto contribui para o aumento da flexibilidade do sistema e para a redução considerável do consumo de reagentes, uma vez que estes são introduzidos na montagem analítica apenas quando necessário (11, 14, 20). Na extremidade oposta localiza-se o êmbolo responsável pelo enchimento ou esvaziamento da seringa.

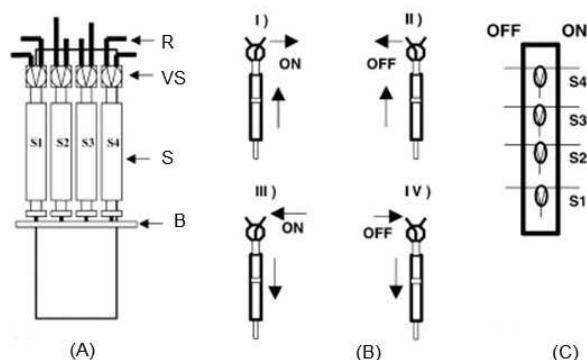


Figura 1.8 – (A) Representação esquemática de uma multi-seringa. VS: válvula solenóide; S: seringas (S1-S4); B: barra condutora dos êmbolos; R: reservatório de solução (B) Direção do fluxo ON: ligado com o sistema; OFF: ligado ao esgoto (C) Representação esquemática do sistema (adaptado de (14)).

O movimento do motor propulsiona simultaneamente os êmbolos das quatro seringas, trabalhando em modo multicanal (4), próprio das bombas peristálticas utilizadas

em FIA, com a vantagem de não se usarem os tubos de impulsão flexíveis (14) e, ainda, permitir a seleção de volumes exatos, através do computador, característico das bombas de pistão (27).

Assim como em MCFA, a probabilidade de inserção de bolhas de ar, problema comum a praticamente todos os sistemas de fluxo, fica significativamente reduzida dado trabalhar-se com pressões positivas (27).

A utilização de seringas com diferentes volumes (0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 25 mL de capacidade) associada ao número de passos do motor da bureta, possibilita que os diferentes canais da multi-seringa apresentem uma grande variabilidade de caudais (27, 28). Este sistema possibilita a obtenção de diferentes configurações e alternativas para inserção de volumes de amostra e reagente na rede de fluxo, com elevada precisão.

O facto do funcionamento das seringas de pistão requerer o seu reenchimento periódico com as soluções que foram entretanto consumidas, pode comprometer o ritmo de amostragem (27, 29), embora as válvulas solenóides efetuem uma rápida comutação entre as duas posições, demorando cerca de 35 ms, sem que ocorra paragem de movimento do êmbolo (11, 27).

Neste sistema não é hábito utilizar uma das seringas como reservatório de amostra para posterior introdução no sistema de fluxo, uma vez que este procedimento originaria prejuízos tais como contaminação da amostra seguinte por resíduos das anteriores (carryover), levando a lavagens rigorosas e morosas, comprometendo não só o volume de amostra de cada determinação mas também o ritmo de amostragem. Assim, para efetuar a introdução da amostra recorre-se, habitualmente, a dispositivos adicionais tais como válvulas de injeção (4), válvulas seletoras (30) e válvulas solenoides (31), conectadas à multi-seringa e com o propósito de automatizar a amostragem, podendo, este processo, ser realizado quer em termos de tempo (em função da relação tempo/caudal usada durante a fase de amostragem) quer em termos de volume (em função do volume interno de uma porção de tubo bem definida) (32).

A zona de amostra estabelecida com os sistemas MSFIA ocorre de forma semelhante à que acontece em MCFA, sendo possível o estabelecimento da estratégia de amostragem binária. Assim, a zona de amostra é constituída por vários segmentos de amostra e reagente intercalados, o que favorece a homogeneização da mistura durante o transporte e o consequente desenvolvimento das reações químicas.

Existem inúmeras vantagens relativamente às técnicas anteriormente referidas, destacando-se o elevado ritmo de amostragem, comparável aos sistemas FIA, dado que a adição de amostra e reagentes é realizada em paralelo (33), e uma melhor homogeneização dos mesmos, facto que não se alcança com a metodologia SIA.

É evidente a robustez apresentada pelo facto de não se usarem bombas peristálticas, cujos tubos apresentam grande vulnerabilidade a soluções agressivas e orgânicas.

Sendo a amostra e reagentes adicionados somente no momento em que se pretende fazer a determinação o consumo dos mesmos é baixo, à semelhança do que acontece na metodologia SIA.

1.1.6. Análise de fluxo multi-impulsão (MPFS)

A análise em sistemas de fluxo multi-impulsão (MPFS, do inglês “Multi-Pumping Flow Systems”) constitui uma nova estratégia de injeção, homogeneização e comutação de soluções de amostras e reagentes e foi proposta por Lapa *et al.* (34). Tem como base de funcionamento a utilização de micro-bombas solenóides de reduzidas dimensões, para impulsão individual de soluções de amostra e reagentes, o que torna desnecessária a utilização de dispositivos adicionais, nomeadamente dispositivos de inserção de amostra e de comutação. É utilizada uma micro-bomba solenoide para a inserção de cada solução envolvida, o que permite a exploração das capacidades propulsoras e comutadoras, bem como a facilidade de re-direcionamento das soluções. As micro-bombas solenoides possibilitam a implementação de sistemas de configuração muito simples, reduzindo o número de componentes e, desta forma, minimizar a possibilidade de ocorrências de falhas nos equipamentos assim como erros durante a execução do procedimento analítico. A atuação das micro-bombas solenoides dá origem a fluxos pulsados (devido ao deslocamento repentino do diafragma das mesmas), que são caracterizados por um volume (volume de pulso) e uma frequência (frequência de pulso) que combinados estabelecem o caudal individual de cada solução. O volume de solução inserido no sistema é definido pelo volume de pulso da micro-bomba solenoide e pelo número de pulsos selecionados pelo operador, de acordo com a necessidade analítica. Deste modo é possível um controlo efetivo de volumes de amostra e reagentes inseridos, bem como da posição da zona de amostra no percurso analítico. O uso de micro-bombas solenoides permite também a paragem do fluxo, particularmente útil em métodos cinéticos e/ou outras estratégias de análise. O fluxo pulsado é um aspeto relevante dos sistemas MPFS, que pode ser visto como uma sequência contínua de segmentos muito pequenos, em que cada um desses segmentos corresponde a um determinado volume de solução (34). O fluxo pulsado caracteriza-se por um movimento desordenado das soluções em todas as direções, o que faz com que a mistura entre a amostra e reagentes se faça de uma forma

mais rápida e eficaz do que a obtida em condições de fluxo laminar típicas das metodologias de fluxo contínuo clássicas. Isto deve-se ao facto de nos sistemas com fluxo estritamente laminar a sobreposição das soluções de amostra e reagente dependerem exclusivamente de fenómenos de difusão e convecção (35). Consequentemente, em situações de fluxo pulsado obtêm-se sinais analíticos cuja grandeza é superior à dos obtidos em condições de fluxo laminar, com volumes de amostra similares e nas mesmas condições temporais (35). O grau de homogeneização está também relacionado com o volume de pulso. Para volumes maiores de pulso, o contacto entre segmentos de amostra e reagentes é dificultado quando comparado com um volume de pulso menor, no qual o contacto ocorre num menor intervalo de tempo, não sendo necessário a utilização de reatores mais compridos. O volume de pulso desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da reação, afetando de igual modo o perfil do sinal analítico obtido. É de destacar que a natureza pulsada do fluxo pode ser perceptível no registo do sinal analítico (perfil tipo escada), o qual depende do volume e da frequência de pulso, do comprimento e diâmetro interno do reator e também do volume interno da célula de fluxo do detetor.

A combinação do fluxo pulsado com a simplicidade das configurações dos módulos de análise e controlo automatizado e individual das bombas, confere à multi-impulsão os meios necessários para a implementação de metodologias analíticas caracterizadas por um desenvolvimento de reações rápidas, baixo consumo de amostras e reagentes com consequente baixa produção de resíduos, bastante vantajosa no âmbito da Química Verde.

1.1.7. Análise em fluxo em sistemas de interface única (SIFA)

A técnica de análise em fluxo em sistemas de interface única (SIFA-Single Interface Flow Analysis), foi proposta por Ribeiro *et. al*, em 2005 (6). Esta técnica diverge do conceito tradicional de análise em fluxo contínuo, pelo facto de não implicar a inserção de volumes definidos de amostra e reagente no percurso analítico e por se basear na penetração mútua de zonas de amostra e reagente e estabelecimento de gradientes de concentração, numa interface única de reação.

Um sistema SIFA típico, é constituído por buretas automáticas e micro-bombas solenóides como dispositivos de propulsão assim como válvulas solenóides como dispositivos de comutação (Figura 1.9) (6).

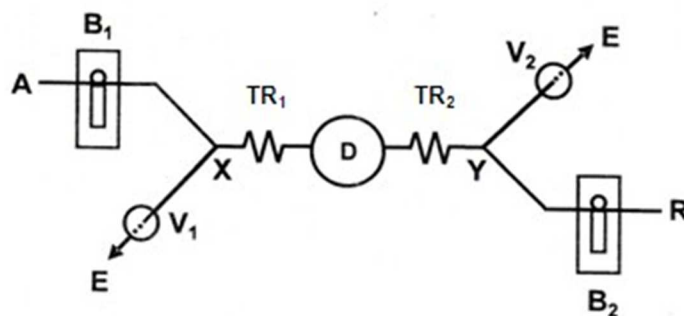


Figura 1.9 – Representação esquemática de um sistema SIFA. B₁ e B₂: buretas automáticas; V₁ e V₂: válvulas solenóides de duas vias; A: amostra; R: reagente; TR₁ e TR₂: tubos reatores; D: detetor; E: esgoto (adaptado de (6)).

Embora a metodologia SIFA apresente algumas semelhanças com a estratégia SIA, particularmente na forma como ocorre a mistura entre a amostra e os reagentes, revela, também, algumas diferenças. Um exemplo é a inexistência de um tubo de armazenamento (“holding coil”), característico dos sistemas SIA, com a vantagem que impede a contaminação da solução transportadora com as soluções aspiradas.

Nos sistemas SIFA o volume de amostra inserido no percurso analítico não constitui um parâmetro crítico uma vez que o desenvolvimento da zona de reação é condicionado pela extensão da sobreposição de zonas adjacentes de amostra e reagente e pela formação de gradientes dinâmicos de concentração, em contraste com o que acontece nas estratégias de gestão de fluidos anteriores onde o volume de amostra se apresenta como um parâmetro fundamental, condicionando o estabelecimento da zona de reação e exigindo um controlo e uma otimização constante.

A maior parte dos sistemas de análise em fluxo colocam o sistema de deteção no final da montagem analítica, quando operam de modo tradicional, originando uma leitura singular da amostra, o que pode ser escasso, por exemplo no caso de estudos cinéticos (36) podendo, também, não compensar a ocorrência de eventuais erros operacionais. A informação obtida através de multideteções efetuadas numa única zona de amostra, como acontece nos sistemas SIFA, pode ser usada para recolha de informação cinética da interface ou o estabelecimento do perfil cinético de uma zona específica, na determinação de multi-componentes, eliminação de espécies interferentes e para o ajuste da sensibilidade e do estabelecimento do intervalo de concentrações onde se verifica uma relação linear entre o sinal analítico e a concentração do analito (37). Em SIFA o posicionamento central do sistema de deteção e a bi-direcionalidade do fluxo permitem a

obtenção de dados analíticos relativamente a uma zona específica ou mesmo a toda a interface de reação.

A reação não é prejudicada pela utilização de reatores de reduzidas dimensões nem reduzidos volumes de amostra e reagente, dado que se pode manipular o tempo de reação (recorrendo a múltiplas inversões no sentido do fluxo) sem que isso provoque um aumento da dispersão e consequentemente decréscimo do sinal analítico, como ocorre nas estratégias de gestão de fluidos em fluxo contínuo anteriores. Destaca-se que com esta técnica as medidas são efetuadas no estado estacionário.

Esta estratégia revela um elevado grau de reprodutibilidade e oferece facilidade na implementação, controlo e otimização destes sistemas, estando minimizada a importância do controlo do volume das soluções de amostra e reagentes para obtenção de um determinado grau de dispersão.

1.2. Líquidos Iónicos (LIs)

Os líquidos iónicos (LIs) são uma classe diversificada de compostos químicos que tem revelado um enorme potencial em diversas áreas quer a nível laboratorial, quer a nível industrial. Estes compostos são definidos como sais orgânicos que se caracterizam principalmente pelo seu baixo ponto de fusão (inferior a 100°C) e pela sua pressão de vapor negligenciável (38), conduzindo a quase nulas emissões para a atmosfera, facto que os torna em potenciais candidatos a substituir os tradicionais solventes orgânicos voláteis (39, 40). Para além destas características, os LIs possuem ainda importantes propriedades como a elevada estabilidade térmica e química, ampla janela eletroquímica e elevada condutividade iónica (41). Estas propriedades peculiares diferenciam estes compostos de outros sais e torna-os atrativos em termos de aplicações num contexto da Química Verde. São constituídos inteiramente por iões, um catião orgânico de grandes dimensões e um anião orgânico ou inorgânico. Habitualmente apresentam elevada viscosidade, apesar da natureza iónica, em termos de polaridade apresentam valores moderados. O interesse por estas substâncias está relacionado não apenas com as suas propriedades físico-químicas únicas acima referidas mas também do facto de estas poderem ser modeladas consoante as necessidades do utilizador, em virtude do elevado número de possíveis combinações entre diferentes catiões e/ou aniões. De um modo geral, estes compostos são miscíveis com solventes polares como a água ou o metanol, e imiscíveis com solventes apolares como éter dietílico e acetato de etilo. No entanto, devido à possibilidade de mutabilidade dos catiões e/ou aniões é possível sintetizar LIs hidrofóbicos miscíveis com a maioria dos solventes orgânicos. Esta versatilidade também permite sintetizar LIs capazes de

ultrapassar a baixa solubilidade de compostos como biopolímeros, açúcares, triglicéridos e outros produtos naturais.

1.2.1. Perspetiva histórica

As primeiras referências à aplicação destes compostos datam de 1914 e surgiram com a síntese de nitrato de etilamónio por Paul Walden cujo ponto de fusão é de 12,5°C (42). Este composto foi, provavelmente, o primeiro a ser descrito na literatura e a respeitar a definição de “líquido iónico” considerada atualmente. Embora relatado pela primeira vez em 1914, a verdadeira definição de LI continua em constante atualização. As várias definições descritas na literatura ao longo dos anos variam entre fase de matéria condensada (cristal iónico e líquido), sistemas cristalinos frágeis e sais com baixa temperatura de fusão.

Os primeiros LIs contendo aniões cloroaluminatos surgiram em 1948 através de Hurley e Wier que usaram estes derivados do catião piridínio como meio eletrólito para redução de catiões de alumínio, para uso em revestimento (43).

Durante a década de 70 e início da década de 80, a investigação deste tipo de sistemas ganhou novo ânimo quando Osteryoung e Wilkes os redescobriram preparando com sucesso novos sais de cloroaluminatos de piridínio e imidazólio respetivamente (44).

Na década de 80, os LIs começaram a ser explorados, nomeadamente como possíveis estabilizadores de certos metais de transição. Seddon foi um grande impulsionador na investigação de LIs, estudando concretamente a estabilidade de complexos de molibdénio na presença de sais cloroaluminatos de piridínio e imidazólio (45).

Na segunda metade da década de 80 novas aplicações foram publicadas pelo grupo de Wilkes (46), demonstrando resultados promissores do uso de LIs como meio reacional e catalisador em alquilações e acilações de Friedel-Crafts. Em paralelo, Poole e os seus colaboradores, anunciaram mais um avanço nesta área, com o uso de nitrato de etilamónio como fase estacionária em cromatografia (47). Foi também anunciado por Magnuson, o primeiro estudo em sistemas de LIs com enzimas. A partir daí, os LIs começaram a despertar o interesse em catálise sendo usados por Chauvin *et al* (48), já na década de 90, na dimerização do propeno, usando para tal cloroaluminatos de imidazólio, piridínio e fosfónio.

Foi no início da década de 90 que o conceito de LI recebeu o impulso mais significativo para o interesse no seu estudo, quando Wilkes *et al* (49), prepararam LIs estáveis da família de catiões imidazólio em meio aquoso. Estes sais orgânicos eram constituídos

pelo catião 1-etil-3-metilimidazólio e por aniões inorgânicos tais como o hexafluorofosfato $[\text{PF}_6]^-$ e o tetrafluoroborato $[\text{BF}_4]^-$. Nesta altura Seddon publica um artigo sobre o uso de LIs no âmbito da tecnologia “limpa” (50). No mesmo ano, Howarth descreve a primeira síntese de LIs quirais (51). Mais tarde foi verificado que os LIs compostos pelos aniões PF_6 ou BF_4 podiam sofrer hidrólise na presença de ácidos e água, originando ácido fluorídrico, um conhecido composto tóxico (52).

Decorrente do aprofundar da investigação nesta área, tem-se vindo a demonstrar que os LIs têm inúmeras aplicações, sendo as suas características peculiares uma mais valia na utilização destes compostos, sendo por isso que se tornaram uma alternativa bastante promissora como meio reacional no âmbito da Química Verde.

Entre as famílias de catiões orgânicos (Figura 1.10) mais usuais na constituição dos LIs encontram-se os imidazólios (a), amónios (b), fosfónios (c), piridínios (d), pirrolidínios (e), sulfónios (f), pirazólios (g), tiazólios (h) e guanidínios (i).

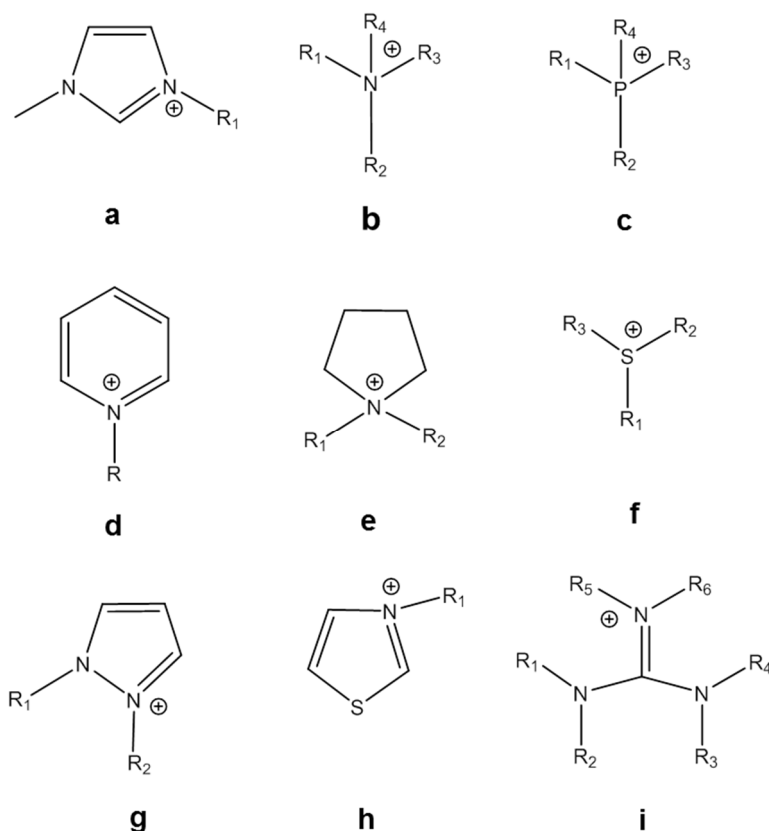


Figura 1.10 – Representação da estrutura química de alguns catiões usualmente estudados.

Quanto aos aniões mais usados (Figura 1.11) existe uma enorme variedade onde se destacam exemplos de aniões inorgânicos como halogenetos (a), cloroaluminatos (b), hexafluorofosfato (c) e tetrafluoroborato (d).

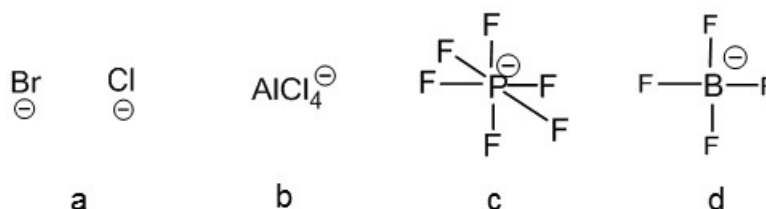


Figura 1.11 – Representação da estrutura química de alguns aniões usualmente estudados.

Existe uma subclasse específica de LIs especialmente interessante, os Room Temperature Ionic Liquids (RTILs) (53). Estes caracterizam-se por serem líquidos à temperatura ambiente tendo por isso um maior interesse dentro desta classe de sais. Estes compostos abrem muitas perspectivas a diferentes níveis de aplicação, nomeadamente, na indústria farmacêutica (54-56).

A intensa investigação nesta área originou uma grande evolução nas últimas décadas, sendo já possível classificar três gerações distintas de LIs com base nas suas propriedades e características. Na primeira geração estão incluídos compostos que exibem propriedades físicas únicas, tais como baixa pressão de vapor, ou alta estabilidade térmica. A segunda geração é caracterizada pela possibilidade de se poder conjugar algumas das propriedades físicas com propriedades químicas. Os LIs de terceira e mais recente geração para além de propriedades físicas e químicas específicas acumulam também atividade biológica, com toxicidade reduzida, devido à utilização de iões estáveis, seguros e biodegradáveis (57, 58).

Os LIs, devido às suas características particulares, têm sido utilizados em várias áreas (Figura 1.12), encontrando-se no topo destas o seu uso como solvente alternativo na síntese orgânica devido à sua baixa volatilidade e elevada estabilidade térmica. Outras aplicações incluem síntese catalítica, coordenação química, química analítica, materiais poliméricos e eletroquímicos (59) e nanotecnologia (60, 61). Recentemente têm sido aplicados na área farmacêutica como intermediários na síntese de fármacos ou formação de LIs farmacologicamente ativos (LI-APIs). Estes LIs possuem um ião farmacologicamente ativo e que permite alterar determinadas características desvantajosas dos fármacos.

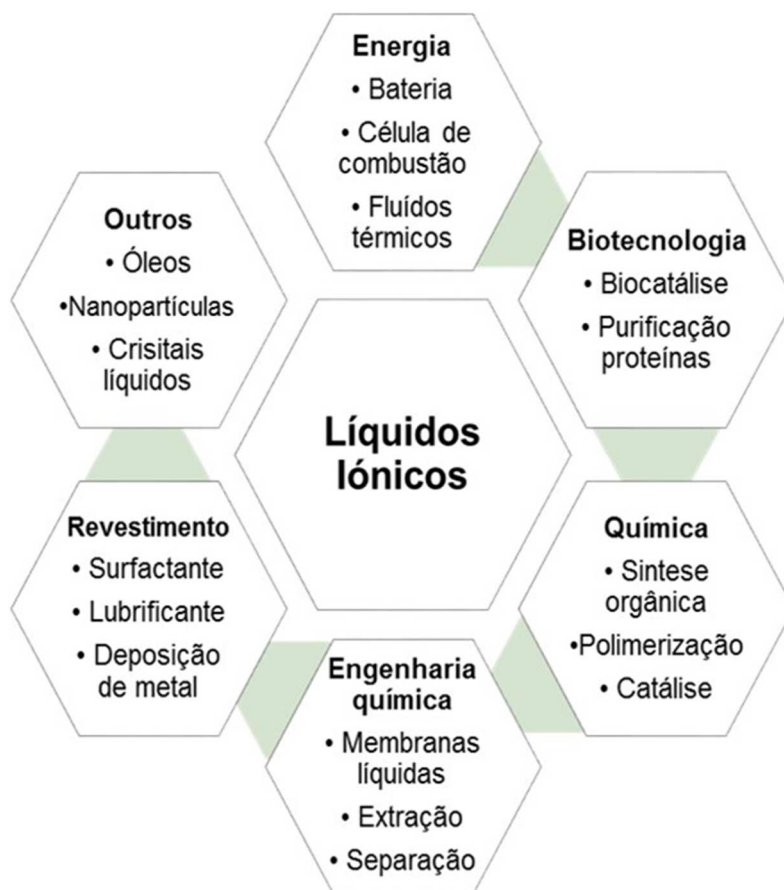


Figura 1.12 – Aplicabilidade de LIs por áreas.

1.2.2. Interação de líquidos iônicos com enzimas

1.2.2.1. Substituição de solventes orgânicos em biocatálise

Os LIs têm ganhado uma importância crescente como solventes alternativos aos meios orgânicos em processos biotecnológicos (62). Desde então, a sua utilização tem sido amplamente avaliada como solventes em catálise (63) e, principalmente, em biocatálise (64).

As enzimas são proteínas que têm como função catalisar reações químicas no interior das células dos seres vivos em que se encontram presentes. O meio predominante no interior das células é a água, embora as enzimas não sejam capazes de funcionar corretamente em meios formados unicamente por água pura. No seu ambiente natural existem outros compostos como lipídios, proteínas e outras espécies iônicas, além da água.

A evidência de que na presença de quantidades residuais de água, as enzimas adquirem uma estrutura rígida, que lhes permitem obter a estabilidade necessária para a realização dos processos catalíticos, levou a enormes progressos nesta área de investigação. Por outro lado, Klibanov (2001) (65) observou que na presença de solventes orgânicos anidros as mesmas mantinham a sua estrutura original. Estas observações tiveram um forte impacto na indústria, consequentemente verificou-se um aumento na utilização de enzimas em meios não convencionais, pois muitas das reações de interesse comercial envolvem compostos hidrofóbicos, cuja produtividade em sistemas aquosos é reduzida (66). A biocatálise recorrendo a LIs foi relatada pela primeira vez em 2000 (67).

Existem diversas vantagens na utilização de meios não convencionais em biotransformações, principalmente pelos seguintes aspetos (68):

- maior solubilidade de substratos e/ou produtos hidrofóbicos;
- facilidade na recuperação de produtos e de enzimas do meio reacional, devido ao baixo ponto de ebulição dos solventes;
- possibilidade de realização de reações que sejam termodinamicamente desfavoráveis na presença de água;
- maior estabilidade da enzima; pois o processo de desnaturação é difícil em meios não aquosos;
- estratégias de imobilização facilitadas; uma vez que as enzimas não se desagregam facilmente dos suportes.

No entanto, também existem algumas desvantagens da utilização destes meios nomeadamente:

- toxicidade de alguns solventes;
- baixa atividade apresentada por certas enzimas comparativamente a meios aquosos.

Na literatura estão descritos trabalhos que mostram que os LIs podem melhorar o desempenho das enzimas relativamente aos solventes orgânicos, em termos de atividade catalítica, enantioselectividade e estabilidade. As lípases são as mais utilizadas em processos biocatalíticos na presença de LIs, estas são largamente usadas em síntese orgânica em reações de transesterificação. Estas reações de transesterificação são normalmente efetuadas em solventes não aquosos para evitar processos hidrolíticos paralelos indesejáveis. Lozano et al. (2002) (69) verificaram que uma determinada lipase, na forma livre, ou imobilizada, exibiu uma estabilidade térmica bastante superior quando colocada na presença de um LI do que em solventes orgânicos, fenómeno possivelmente decorrente da formação de uma cobertura protetora do LI sobre a enzima, alterando o seu

microambiente. Estudos espectroscópicos mais recentes efetuados com uma protease e uma lipase mostraram que a estabilidade criada pelas enzimas nos LIs deve-se a alterações estruturais que dão origem a uma estrutura mais compacta, com maior percentagem de folhas β (70).

As lipases são amplamente utilizadas na indústria alimentar no processamento de gorduras e azeite. Estas enzimas são capazes de transformar matérias primas económicas em gorduras de alto valor adicionado. Sendo um exemplo a produção de manteiga de cacau. Esta reação apresentou uma elevada eficácia quando efetuada num meio aquoso com LIs (71).

Vários trabalhos têm mostrado que a presença de uma certa quantidade de água ajuda na manutenção da estrutura terciária e atividade da enzima nos processos de biocatálise (72). Estudos de estabilização de enzimas em LI evidenciam que alguns destes solventes apresentam uma maior eficiência em estabilizar a enzima, dado que a atividade catalítica mantém-se elevada por mais tempo mesmo em condições drásticas (150°C), pois são capazes de contribuir para a enzima manter uma dada hidratação. Alguns trabalhos de biocatálise têm mostrado vantagens no uso simultâneo de meios aquosos e LIs (73).

Os LIs habitualmente mais usados em biocatálise apresentam pontos de fusão inferiores à temperatura ambiente, estes baseiam-se em catiões orgânicos, como tetralquilamónio, alquilpiridínio, 1,3-dialquilimidazólio e tetralquifosfónio, associados a aniões com fortes cargas negativas, tais como BF_4^- (tertrafluoroborato), PF_6^- (hexafluorofosfato), SbF_6^- (hexafluoroantimónio), NO_3^- (nitrato) e CF_3SO_3^- (trifluorometanosulfonato), entre outros (64).

1.2.2.2. Avaliação da toxicidade

Tal como referido, os LIs têm sido considerados um meio reacional alternativo aos solventes orgânicos voláteis, atrativo no âmbito da Química Verde. No entanto, o crescimento do número de publicações com potenciais aplicações, bem como a descrição de aplicações em alguns processos industriais e consequentemente risco de utilização massiva futuramente, exige uma análise toxicológica cuidadosa destes compostos antes de serem eliminados para o meio ambiente.

A avaliação da toxicidade de substâncias químicas tornou-se um processo cada vez mais comum no contexto da indústria química. A preocupação com o potencial de toxicidade e ecotoxicidade das substâncias fez com que muitos países e agências regulamentadoras definissem políticas de segurança e exigissem processos de avaliação toxicológica de produtos químicos. Como por exemplo, o REACH (Registration, Evaluation,

Authorisation and Restriction of Chemicals), uma regulamentação recente que tem vindo gradualmente a ser implementada pela União Europeia.

A toxicidade dos LIs foi avaliada pela primeira vez por Jastorff e coautores em 2002, através de estudos de relação estrutura-atividade. Neste trabalho, foi proposta uma análise de risco multidimensional para dois LIs: bmim [BF₄] (tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio) e dmim [BF₄] (tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazólio); a acetona foi usada como solvente orgânico de referência. No âmbito da análise de risco multidimensional foram avaliados cinco parâmetros ecotoxicológicos: libertação, intervalo espaço-temporal, bioacumulação, atividade biológica e incerteza. Cada parâmetro foi avaliado numa escala de 1-4, correspondendo o 1 a muito baixo risco e o 4 a elevado risco. Os resultados obtidos indicaram que o risco de libertação dos LIs para o ambiente era baixo, no entanto o risco relativamente à incerteza foi alto devido à falta de informação quanto à bioacumulação. O parâmetro intervalo espaço-temporal também apresentou risco elevado. Entre os dois LIs avaliados o dmim [BF₄] apresentou maior risco de bioacumulação devido à semelhança molecular com os lípidos membranares. Na atividade biológica verificaram tal como no ensaio anterior que a molécula com maior cadeia carbonada era a mais tóxica.

Têm sido feitos alguns estudos de toxicidade e biodegradabilidade de alguns LIs, as famílias de LIs mais estudadas são baseadas nos catiões do tipo imidazólios, amónios e fosfónios embora já existam alguns estudos em catiões piridínios e pirrolidínios. De uma maneira geral, os sais são estudados quanto ao efeito que determinadas características têm sobre o seu comportamento biológico. Estas características podem incluir o tamanho da(s) cadeia(s) lateral(ais), a presença de funções orgânicas como álcoois, éteres ou ésteres e o anião que compõe os LIs. Estes estudos são indicadores do grau de toxicidade dos catiões e aniões usados e compará-los entre si, estas informações são muito relevantes no modo de orientar a síntese de novos LIs de menor toxicidade.

A toxicidade dos LIs tem sido avaliada em vários alvos biológicos, tais como animais (74-76), plantas (77, 78), microrganismos (79) e várias linhas celulares (80), Figura 1.13.

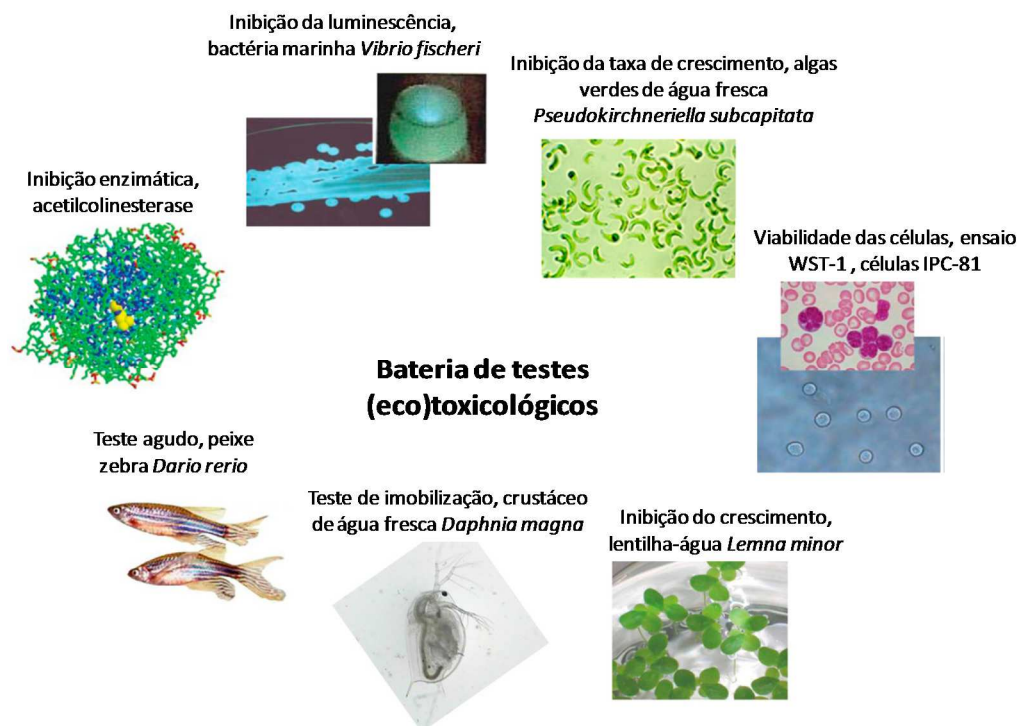


Figura 1.13 – Alguns dos sistemas biológicos utilizados na avaliação da toxicidade dos LIs. Adaptado de: Pham *et al.*, 2010, (40).

Vários animais têm sido utilizados no estudo da toxicidade de diversos LIs. Roger e colaboradores (81) investigaram a toxicidade destes compostos em nematodos (*Caenorhabditis elegans*). Os LIs usados foram o [C₄mim] Cl, [C₈mim] Cl e [C₁₄mim] Cl para avaliar a sobrevivência do *C. elegans*. Verificaram que os compostos [C₄mim] Cl e [C₈mim] Cl não apresentaram toxicidade aguda no *C. elegans*, enquanto o [C₁₄mim] Cl apresentou uma ligeira toxicidade. Os resultados são semelhantes aos obtidos com outros organismos, em que os LIs com longas cadeias alquílicas apresentam maior toxicidade.

Bernot e colaboradores estudaram a sobrevivência e as alterações de locomoção em caracóis de água doce (*Physa acuta*) na presença de LIs com grupos de catiões imidazólios e piridínios. (82). A toxicidade aguda destes LIs foi analisada pelo método do LC₅₀. Estes estudos concluíram que o comprimento da cadeia alquílica influencia a toxicidade, ou seja, os LIs com C₈ revelaram uma maior toxicidade quando comparados com os LIs com C₆ ou C₄, independentemente do tipo de catião. O aumento da lipofilicidade dos LIs com longas cadeias alquílicas, os quais poderão se incorporar entre os grupos polares das membranas fosfolipídicas, poderá ser uma explicação para os resultados obtidos.

Landry e colaboradores usaram os ratos Fischer 344 para testar a toxicidade aguda do [C₄mim] Cl (83). Observaram que a administração de 175 mg/Kg de [C₄mim] Cl nos ratos não influenciava o seu peso corporal, atividade e estado de saúde durante o período de duas semanas. No entanto, quando a concentração era elevada para 550 mg/Kg, ocorria a morte dos ratos. Para concentrações de 2000 mg/Kg todos os ratos morriam no mesmo dia, com sinais clínicos adversos como hipotermia e alterações de postura.

Mais recentemente, Pretti e colaboradores avaliaram a toxicidade aguda e alterações histológicas no peixe Zebra (*Danio rerio*) após exposição aos LIs. Os resultados obtidos na presença de LIs com grupos imidazólios, piridínios e pirrolidínios e diferentes aniões foram de LC₅₀ superior a 100 mg/L, ou seja, os LIs apresentaram baixa toxicidade. (84).

Tal como referido anteriormente, pelas suas características peculiares, os LIs exibem risco de toxicidade aquática, pelo que o estudo do seu impacto em ecossistemas aquáticos é importante. Nestes ambientes, as algas são produtoras primárias e como tal têm um papel crucial no sistema ecológico, pois fornecem energia a níveis tróficos superiores. Apresentam também distribuição ubiqüitária, curto ciclo de vida e respondem rapidamente a alterações ambientais o que as torna interessantes para estudos biológicos (40). Assim sendo, as algas são frequentemente usadas no estudo do impacto de compostos no ambiente, sendo esta prática recomendada por várias organizações (60). As algas mais utilizadas incluem, as algas Bálticas (*Oocystis submarina* e *Cyclotella meneghiniana*) (40), a *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente conhecida como *Selenastrum capricornutum*), a *Scenedesmus vacuolatus* (40), a *Phaedactylum tricornutum* e a *Dunaliella tertiolecta* (85).

A *Daphnia magna* é um organismo invertebrado aquático também frequentemente utilizado em ensaios toxicológicos, já que é fácil de cultivar em laboratório. Este organismo avalia essencialmente a toxicidade dos compostos na reprodução e na sobrevivência. A toxicidade aguda e crónica da *Daphnia magna* na presença de LIs com o grupo imidazólio foi descrito pela primeira vez por Bernot e colaboradores (82). Nos seus ensaios verificaram que os LIs com grupos imidazólios e vários aniões como, Cl⁻, Br⁻, PF₆⁻ e BF₄⁻, mostraram uma toxicidade equivalente aos solventes usados na indústria química, como o amoníaco e o fenol.

Os micro-organismos são importantes no ecossistema pois participam nos ciclos de elementos como o carbono e azoto além de estarem envolvidos na reciclagem da matéria orgânica. Em particular, as bactérias são utilizadas frequentemente como ponto de partida na avaliação da relação estrutura-atividade dos LIs, pois apresentam tempos rápidos de geração (40, 60).

A atividade antibacteriana tem vindo a ser estudada em várias espécies, tais como, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobaccillus rhamnosus*, *Lactobacillus homochiochii*, *Lactobacillus fructivorans*, *Clostridium sporogenes*, *Pichia pastoris* e *Bacillus cereus* (40).

A *Vibrio fischeri* é uma bactéria aquática com capacidade de bioluminescência utilizada com frequência em ensaios biológicos, pois o método usado é simples, rápido, e de baixo custo (86).

Com a crescente utilização dos LIs na indústria, é importante efetuar estudos não só, em micro-organismos mas também em células humanas. Os micro-organismos permitem aumentar o conhecimento sobre a toxicidade de um composto relativamente ao meio ambiente, enquanto as células humanas dão informações sobre os efeitos que determinado produto pode ter na saúde humana. Dentro destes estudos são, normalmente, usadas células tumorais verificando-se o efeito que os compostos alvo têm sobre as mesmas.

Além destes, os ensaios de inibição enzimática têm sido referidos com o objetivo de prever a toxicidade de LIs nos humanos. Atualmente é aceite que a avaliação da toxicidade química através da inibição enzimática representa uma abordagem interessante principalmente devido à sua simplicidade e baixo custo (87). Assim, enzimas como a carboxilesterase (88), catalase (89), pepsina (90), lipase (91), acetilcolinesterase (92), adenosina deaminase (93) e papaína (94) são utilizadas em vários estudos.

Apesar do progresso efetuado nesta área o conhecimento do mecanismo de interação entre os LIs e as enzimas ainda é limitado. Geralmente, o local ativo das enzimas está localizado nas suas regiões hidrofóbicas. As pontes de hidrogénio são de extrema importância para a manutenção da atividade enzimática, alguns trabalhos revelam que as pontes de hidrogénio a as interações entre os LIs e as enzimas parecem ter uma influência negativa na atividade das enzimas (90).

A acetilcolinesterase é uma das enzimas mais estudadas, pois encontra-se presente nas células eucarióticas e é responsável pela degradação da acetilcolina, um neurotransmissor. Alterações na sua atividade conduzem a alterações no sistema nervoso de microrganismos. Vários grupos de catiões foram usados nos ensaios *in vitro* da avaliação da sua atividade como por exemplo, tetrabutílfosfónio [Br], tetrabutílamónio [Br], 1-butil-1-metil-pirrolídiínio [Cl], 1-hexil-3-metilimidazólio [Cl], 1-metil-1-butil-piperidíínio [Cl], 1-butil-1-metil-piridíínio [Cl] e 1-butil-quinolinio [Cl], os quais diminuíram a atividade da enzima em 50% com concentrações de 407,38; 199,53; 83,18; 83,18; 67,61; 50,12 e 6,17 μM , respetivamente (95). A AMP deaminase é outra enzima muito utilizada em ensaios de toxicidade. Está envolvida em muitos processos celulares que incluem nucleótidos, fosfato

inorgânico, fosfolípidos, ácidos gordos e aminoácidos. Os LIs também inibiram esta enzima, como por exemplo o 1-butil-imidazólio com o anião BF_4^- e PF_6^- (93).

Enzimas do sistema antioxidante também são muito usadas e o LI 1-octil-metilimidazólio [Br], mostrou a capacidade de diminuir significativamente a atividade da catalase (96).

Dado o elevado número de possíveis LIs é necessário otimizar o processo de avaliação toxicológica e estudos QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) tornaram-se uma ferramenta essencial para a avaliação da toxicidade, reduzindo o tempo, custos e experimentação animal. Estes estudos visam o estabelecimento de relações quantitativas entre a estrutura e/ou propriedades moleculares e os dados de toxicidade.

1.3. Enquadramento geral e objetivos propostos

Os LIs têm sido alvo de crescente atenção devido às suas características peculiares, sendo considerados um meio reacional muito promissor com reduzido impacto ambiental. Estes solventes têm vindo a ser utilizados em procedimentos biocatalíticos, como substitutos dos solventes orgânicos, dado que inúmeras enzimas mantêm a sua atividade neste meio reacional podendo, em vários casos, até aumentá-la (67). Devido à crescente variedade de aplicações destes compostos, torna-se imperativo efetuar ensaios de avaliação de toxicidade, no sentido de prever o impacto na saúde humana e no meio ambiente.

Com esse objetivo, irão ser desenvolvidos diferentes ensaios enzimáticos em meios constituídos por LIs em sistemas de fluxo baseados na técnica SIA. Os compostos estudados terão diferentes estruturas químicas para uma melhor interpretação da influência dos grupos catiónicos e aniónicos nos resultados.

A crescente procura de métodos automatizados, com redução do consumo de reagentes e produção de resíduos, e a substituição dos reagentes tóxicos, estão em concordância com os princípios da Química Verde. Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema automático de fluxo pode por em prática estes princípios, nomeadamente quando se desenvolve um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) (2), com vantagens em termos de consumo de reagentes, produção de efluentes, diminuindo ou evitando, desta forma, os efeitos indesejáveis de alguns métodos analíticos. Esta metodologia permite um controlo rigoroso das condições reacionais em termos de tempo e espaço, o que permite a fácil implementação de determinações cinéticas, nas quais é necessário um controlo preciso do tempo de paragem do fluxo.

O trabalho apresentado nesta tese, visa a integração de dois importantes aspetos: a possibilidade de implementar alternativas menos poluentes relativamente a processos químicos existentes, utilizando a técnica SIA e a utilização de enzimas como parte integrante dos procedimentos analíticos. As enzimas, são produtos naturais biodegradáveis com reduzido impacto ambiental, sendo também conhecidas pela sua elevada especificidade, seletividade e eficiência, o que torna as determinações em que estão envolvidas menos sujeitas a interferências.

Nas diferentes situações analíticas, e dependendo do substrato e da ligação substrato/enzima que se pretendam avaliar, serão estabelecidas as condições ótimas à atividade biocatalítica da enzima tais como, concentração da enzima e do substrato, pH, temperatura, meio reacional, entre outras. Serão alvo de automatização ensaios enzimáticos com vista à determinação da atividade enzimática e sua inibição em meios aquosos e em meios não convencionais, como os constituídos por LIs e solventes orgânicos.

O desenvolvimento dos diferentes procedimentos analíticos terá também em linha de conta a forma como a própria enzima se apresenta, em solução ou imobilizada, e serão efetuadas avaliações comparativas com o objetivo de estabelecer as condições de estabilidade ótimas para a enzima em estudo, a eficiência da catálise, bem como parâmetros relacionados com a determinação analítica, nomeadamente a sensibilidade e a precisão.

1.4. Referências bibliográficas

1. M. Valcárcel MDLdC. Flow-Injection Analysis, Principles and Applications: John Wiley and Sons, New York; 1987.
2. Ruzicka J, Marshall GD. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Anal Chim Acta*. 1990(237):329.
3. Reis BF, Giné MF, Zagatto EAG, Lima JLFC, Lapa RA. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Anal Chim Acta*. 1994;293(1):129-38.
4. Albertús F, Horstkotte B, Cladera A, Cerdà V. A robust multisyringe system for process flow analysis. Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. *Analyst*. 1999(124):1373-81.
5. Lapa RAS, Lima JLFC, Reis BF, Santos JLM, Zagatto EAG. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. *Analytica Chimica Acta*. 2002;466(1):125-32.
6. Ribeiro MFT, Santos JLM, Lima JLFC, Dias ACB, Zagatto EAG. Single reaction interface in flow analysis. *Talanta*. 2005;68(2):351-8.
7. Ruzicka J, Hansen EH. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal Chim Acta*. 1975(78):145-57.
8. J. Ruzicka EHH. Flow Injection edição, editor. Nova York: John Wiley and Sons; 1988.
9. Linden WEvd. Classification and definition of analytical methods based on flowing media. *Pure Appl Chem*. 1994;66:2493-500.
10. Cerdà V, Estela JM, Forteza R, Cladera A, Becerra E, Altimira P, et al. Flow techniques in water analysis. *Talanta*. 1999;50(4):695-705.
11. Miro M, Gomez E, Estela JM, Casas M, Cerda V. Sequential injection 90Sr determination in environmental samples using a wetting-film extraction method. *Anal Chem*. 2002;74(4):826-33.
12. Ruzicka J. The second coming of flow-injection analysis. *Anal Chim Acta*. 1992;261(1-2):3-10.
13. Ivaska A, Ruzicka J. From Flow Injection to Sequential Injection: Comparison of Methodologies and Selection of Liquid Drives. *Analyst*. 1993;118:885-9.
14. Cerdà V. Introducción a los Métodos de Análisis en Flujo. In: Maiorca Pd, editor. *SCIWARE2006*.

15. Taljaard RE, Staden JFv. Application of Sequential-Injection Analysis as Process Analyzers. *Lab Robotics Automat.* 1998;10:325-37.
16. Guebeli T, Christian GD, Ruzicka J. Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. *Anal Chem.* 1991;63(21):2407-13.
17. Staden JV, Botha A. Evaluation of the operational parameters affecting dispersion in sequential injection analysis *Chem.* 1998;51:100-8.
18. Marshall GD, Staden JFv. Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analyses. *Process Control and Quality.* 1992;3:251-61.
19. Ruzicka J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *Analyst.* 2000;125:1053-60.
20. Cerdá V, Estrela JM. Automatic pre-concentration and treatment for the analysis of environmental samples using non-chromatographic flow techniques. *Int J Environ Anal Chem.* 2005;85(4-5):231-53.
21. Ruzicka J, Hansen EH. Retro-review of flow-injection analysis. *Trac Trends Anal Chem.* 2008;27(5):390-3.
22. Reis BF, Giné MF, Zagatto EAG, Lima JLFC, Lapa RA. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Anal Chim Acta.* 1994;293(1-2):129-38.
23. Oliveira CC, Sartini RP, Reis BF, Zagatto EAG. Multicommutation in flow analysis. Part 4. Computer-assisted splitting for spectrophotometric determination of copper and zinc in plants. *Anal Chim Acta.* 1996;332(2-3):173-8.
24. Icardo MC, Mateo JVG, Calatayud JM. Multicommutation as a powerful new analytical tool. *Trac-Trend Anal Chem.* 2002;21(5):366-78.
25. Rocha FRP, Reis BF, zagatto EAG, Lima JLFC, Lapa RAS, Santos JLM. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Anal Chim Acta.* 2002;468(1):119-31.
26. Zagatto EAG, Reis BF, Oliveira CC, Sartini RP, Arruda MAZ. Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis. *Anal Chim Acta.* 1999;400(1-3):249-56.
27. Horstkotte B, Elsholz O, Cerdá V. Review on Automation using Multisyringe Flow Injection Analysis. *J Flow Injection Anal.* 2005;22(2):99-109.
28. Armas G, Miró M, Cladera A, Estrela JM, Cerdá V. Time-based multisyringe flow injection system for the spectrofluorimetric determination of aluminium. *Anal Chim Acta.* 2002;455(1):149-57.
29. Cerdá V, Pons C. Multicommutated flow techniques for developing analytical methods. *Anal Chem.* 2006;25(3):236-42.

30. Albertus F, Cladera A, Becerra E, Cerda V. A robust multi-syringe system for process flow analysis. Part 3. Time based injection applied to the spectrophotometric determination of nickel(II) and iron speciation. *Analyst*. 2001;126(6):903-10.
31. Segundo MA, Rangel AOSS, Cladera A, Cerdá V. Multisyringe flow system: determination of sulfur dioxide in wines. *Analyst*. 2000;125:1501-5.
32. Segundo MA, Oliveira HM, Lima JLFC, Almeida MIGS, Rangel AOSS. Sample introduction in multi-syringe flow injection systems: comparison between time-based and volume-based strategies. *Anal Chim Acta*. 2005;537(1-2):207-14.
33. Cerdá V. Multisyringe flow injection analysis, a young and promising flow techniques. *J Flow Injection Anal*. 2003;20:203-6.
34. Lapa RAS, Lima JLFC, Reis BF, Santos JLM, Zagatto EAG. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. *Anal Chim Acta*. 2002;466(1):125-32.
35. Lima JLFC, Santos JLM, Dias ACB, Ribeiro MFT, Zagatto EAG. Multi-pumping flow systems: an automation tool. *Talanta*. 2004;64(5):1091-8.
36. A. Rios MDLdC, M. Valcárcel. Multidetector in unsegmented flow systems with a single detector. *Anal Chem*. 1985;57(9):1803-9.
37. Valcárcel M, Castro MDLd, Lázaro F, Rios A. Multiple peak recordings in flow injection analysis. *Anal Chim Acta*. 1989;216:275-88.
38. Moniruzzaman M, Nakashima K, Kamiya N, Goto M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;48(3):295-314.
39. Welton T. Ionic liquids in Green Chemistry. *Green Chem*. 2011;13:225-.
40. Thi Phuong Thuy Pham C-WC, Yeoung-Sang Yun. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *water research*. 2010;44:352-72.
41. Ito S, Unemoto A, Ogawa H, Tomai T, Homma I. Application of quasi-solid-state silica nanoparticles-ionic liquid composite electrolytes to all-solid-state lithium secondary battery. *J Power Sources*. 2012;208:271-5.
42. Walden P. Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. 1914:405-22.
43. Hurley FH. Electrodeposition of Aluminum. *Patente Norte Americana*. 1948;2.446.331.
44. Wilkes JS, Levinsky JA, Wilson RA, Hussey CA. Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. *Inorg Chem*. 1982;21(3):1263-4.
45. Scheffler TB, Hussey CL, Seddon KR, Kear CM, Armitage PD. Molybdenum chloro complexes in room-temperature chloroaluminate ionic liquids: stabilization of

hexachloromolybdate(2-) and hexachloromolybdate(3-). *Inorg Chem.* 1983;22(15): 2099-100.

46. Boon JA, Levinsky JA, Pflug JL, Wilkes JSJ. Friedel-Crafts reactions in ambient-temperature molten salts. *Org Chem.* 1986;51(4):480-3.

47. Pacholee F, Butler HT, Poole CF. Molten organic salt phase for gas-liquid chromatography. *Analy Chem.* 1982;54(12):1938-41.

48. Chauvin YG, B.; Guibard, I. Catalytic dimerization of alkenes by nickel complexes in organochloroaluminate molten salts. *J Chem Soc, Chem Commun.* 1990:1715-6.

49. Wilkes JS, Zaworotko MJ. Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *J Chem Soc, Chem Commun.* 1992:965-7.

50. Sheldon RA. Catalysis: The Key to Waste Minimization. *J Chem Technol Biotechnol.* 1997;68:381-8.

51. Howarth J, Hanlon K, Fayne D, P. M. Moisture Stable Dialkylimidazolium Salts as Heterogeneous and Homogeneous Lewis Acids in the Diels-Alder Reaction. *Tetrahedron letters.* 1997;38(17):3097-100.

52. Swatloski RP, Holbrey JD, Rogers RD. Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *Green Chemistry.* 2003;5:361-3.

53. Wasserscheid P, Welton T. *Ionic Liquids in Synthesis.* 2nd ed. Germany: Wiley-VCH; 2008.

54. Azevedo AMO, Ribeiro DMG, Pinto PCAG, Lúcio M, Reis S, Saraiva MLMFS. Imidazolium ionic liquids as solvents of pharmaceuticals: Influence on HSA binding and partition coefficient of nimesulide. *International Journal of Pharmaceutics.* 2013;443(1-2):273-8.

55. Welton T. Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chem Rev.* 1999;99:2071-83.

56. R.A.Sheldon. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chem.* 2005;7:267-78.

57. Ferraz R, Branco LC, Prudêncio C, Noronha JP, Petrovski Z. Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients. *Chem Med Chem.* 2001;6(6):975-85.

58. Hough WL, Smiglak M, Rodríguez H, Swatloski RP, Spear SK, Daly DT, et al. The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. *New J Chem.* 2007;31: 1429-36.

59. D. Wei AI. Review article. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. *Analytica Chimica Acta.* 2008;607:126-35.

60. D. Zhao YL, Z. Zhang. Review. Toxicity of ionic liquids. *Clean.* 2007;35:42-8.

61. M. Moniruzzaman KN, N. Kamiya, M. Goto. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;48:295-314.
62. Erbeltinger M, Mesiano AJ, Russell AJ. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnology progress*. 2000;16(6):1129-31.
63. Webb PB, Sellin MF, Kunene TE, Williamson S, Slawinand A, J. CHMZD. Continuous Flow Hydroformylation of Alkenes in Supercritical Fluid-Ionic Liquid Biphasic Systems. *J Am Chem Soc*. 2003;125(50):15577-88.
64. Sheldon RA. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chem*. 2005;7:267-78.
65. Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. 2001;409(6817):241-6.
66. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. 2001;409(6817):258-68.
67. Rantwijk Fv, Sheldon RA. Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical reviews*. 2007;107(6):2757-85.
68. Dordick JS, Gorman, L.A.S. . Organic solvents sipp water off enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*. 1991;39(4):392-7.
69. Lozano P, Pérez-Marín AB, De Diego T, Gómez D, Paolucci-Jeanjean D, Belleville MP, et al. Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. *Journal of Membrane Science*. 2002;201(1-2):55-64.
70. De Diego T, Lozano P, Gmouh S, Vaultier M, Iborra JL. Understanding structure-stability relationships of *Candida antartica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules*. 2005;6(3):1457-64.
71. Kotogán A, Kecskeméti A, Szekeres A, Papp T, Chandrasekaran M, Kadaikunnan S, et al. Characterization of transesterification reactions by *Mucoromycotina* lipases in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016;127:47-55.
72. Cao C, Matsuda T. Chapter 3 - Biocatalysis in Organic Solvents, Supercritical Fluids and Ionic Liquids A2 - Stewart, Animesh GoswamiJon D. *Organic Synthesis Using Biocatalysis*: Academic Press; 2016. p. 67-97.
73. Pinto PCAG, Costa SPF, Costa ADF, Passos ML, Lima JLFC, Saraiva MLMFS. Trypsin activity in imidazolium based ionic liquids: evaluation of free and immobilized enzyme. *Journal of Molecular Liquids*. 2012;171:16-22.
74. El-Harbawi M. Toxicity Measurement of Imidazolium Ionic Liquids Using Acute Toxicity Test. *Procedia Chem*. 2014;9:40-52.

75. Dumitrescu G, Ciochină LP, Stana L, Crețescu I, Popescu R, Filimon NM, et al. Acute effects of tetrabutylammonium chloride ionic liquid on the histological structure of liver and kidney in the mouse. *Rom Biotech Lett.* 2014;19(1):8925-34.
76. Tsarpali V, Dailianis S. Toxicity of two imidazolium ionic liquids, [bmim][BF₄] and [omim][BF₄], to standard aquatic test organisms: Role of acetone in the induced toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;117:62-71.
77. Das RN, Roy K. Predictive modeling studies for the ecotoxicity of ionic liquids towards the green algae *Scenedesmus vacuolatus*. *Chemosphere.* 2014;104:170-6.
78. Deng Y, Beadham I, Wu J, Chen XD, Hu L, Gu J. Chronic effects of the ionic liquid [C₄mim][Cl] towards the microalga *Scenedesmus quadricauda*. *Environ Pollut.* 2015;204:248-55.
79. Ma SY, Lv M, F.F. Deng XYZ, H.L. Zhai WJL. Predicting the ecotoxicity of ionic liquids towards *Vibrio fischeri* using genetic function approximation and least squares support vector machine. *J Hazard Mater.* 2015;283(11):591-8.
80. Zhao YS, Zhao JH, Huang Y, Zhou Q, Zhang XP, Zhang SJ. Toxicity of ionic liquids: Database and prediction via quantitative structure–activity relationship method. *J Hazard Mater.* 2014;278:320-9.
81. Swatloski RP, Holbrey JD, Memon SB, Caldwell GA, Caldwell KA, Rogers RD. Using *Caenorhabditis elegans* to probe toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride based ionic. *Chem Commun.* 2004:668-9.
82. Bernot RJ, Kennedy EE, Lamberti GA. Effects of ionic liquids on the survival, movement, and feeding behavior of the freshwater snail, *Physa acuta*. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2005;24(7):1759-65.
83. Landry DT, Brooks K, Poche D, Woolhiser M. Acute Toxicity Profile of 1-Butyl-3-Methylimidazolium Chloride. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 74(3):559-65.
84. Pretti C, Chiappe C, Pieraccini D, Gregori M, Abramo F, Monni G, et al. Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*). *Green Chemistry.* 2006;8(3):238-40.
85. DeLorenzo ME, Fleming J. Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2008;54:203-10.
86. Ventura SPM, Marques CS, Rosatella AA, Afonso CAM, Goncalves F, Coutinho JAP. Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2012;76:162-8.
87. A.C. Składanowska PS, K. Kleszczynska, B. Dmochowski. *Environm Toxic Pharm.* 2005;19:291-6.

88. Costa SPF, Justina VD, K. Bica MV, Pinto PCAG, Saraiva MLMFS. Automated evaluation of pharmaceutically active ionic liquids' (eco)toxicity through the inhibition of human carboxylesterase and *Vibrio fischeri*. *J Hazard Mater*. 2014;265:133-41.
89. Pinto PCAG, Costa ADF, Lima JLFC, Saraiva MLMFS. Automated evaluation of the effect of ionic liquids on catalase activity. *Chemosphere*. 2011;82(11):1620-8.
90. Fan Y, Zhang S, Wang Q, J. Li HF, Shan D. Investigation of the Interaction of Pepsin with Ionic Liquids by Using Fluorescence Spectroscopy. *Appl Spectrosc*. 2013;67(6):648-55.
91. Guncheva M, Paunova K, Yancheva D, I. Svinyarov MB. Effect of two series ionic liquids based on non-nutritive sweeteners on catalytic activity and stability of the industrially important lipases from *Candida rugosa* and *Rhizopus delemar*. *J Mol Catal B: Enzym*. 2015;117:62-8.
92. F. Worek TW, M. Koller, H. Thiermann. Reactivation kinetics of a series of related bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase-structure–activity relationships. *Biochem Pharmacol*. 2012;83:1700–6.
93. AC S, P S, K K, B. D. AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics: A potential molecular method for risk assessment of synthetic nitro- and polycyclic musks, imidazolium ionic liquids and N-glucopyranosyl ammonium salts. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2005;19(2):291-6.
94. Fan Y, Yan J, Zhang S, Li J, Chen D, Duan P. Fluorescence Spectroscopic Analysis of the Interaction of Papain with Ionic Liquids. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168:592-603.
95. Arning J, Dringen R, Schmidt M, Thiessen A, Stolte S, Matzke M, et al. Structure-activity relationships for the impact of selected isothiazol-3-one biocides on glutathione metabolism and glutathione reductase of the human liver cell line Hep G2. *Toxicology*. 2008;246(2-3):203-12.
96. M Y, SM L, XY L, BJ Z, JJ W. Acute effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system of mouse liver. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2008;71(3):903-8.

CAPÍTULO 2

Aspetos gerais da parte experimental

2.1. Aspectos gerais da parte experimental

2.1.1.Introdução

Neste capítulo são descritos os aspetos experimentais, comuns aos diversos trabalhos realizados, de modo a evitar repetições subsequentes nas seções experimentais de cada capítulo. São assim referidos os procedimentos gerais usados na preparação das soluções, bem como os materiais, técnicas e produtos usados. São ainda apresentados os procedimentos de otimização seguidos no desenvolvimento das metodologias propostas e o tratamento estatístico para avaliar a qualidade dos resultados obtidos. Referem-se, ainda, os programas informáticos utilizados para o controlo dos sistemas e para a aquisição do sinal analítico.

2.1.2.Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados para a preparação das soluções foram de qualidade p.a. ou semelhante, sem qualquer processo de tratamento ou purificação adicional.

Na preparação das soluções utilizou-se água desionizada com condutividade específica inferior a $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$, obtida por passagem em resinas de troca iónica de leito misto, incorporadas num aparelho de desionização da marca Millipore, modelo RG.

As soluções padrão foram obtidas por pesagem rigorosa do respetivo reagente sólido numa balança analítica e dissolução do mesmo em solvente adequado, em material de vidro de classe A. As soluções padrão de trabalho foram obtidas por diluição rigorosa da solução padrão mais concentrada, utilizando pipetas volumétricas de diferentes volumes ou pipetas automáticas e balões volumétricos; as pipetas automáticas Gilson modelos P20, P100, P1000 e P5000 de volume variável e com capacidades máximas de 20, 100, 1000 e 5000 μL , respetivamente, foram regularmente calibradas com água.

Na secção de material e métodos de cada um dos seguintes capítulos (3 a 6) irão descrever-se todos os reagentes utilizados ao longo dos trabalhos realizados e os cuidados obedecidos na preparação das soluções quando justificável.

2.1.3. Componentes dos sistemas de fluxo

2.1.3.1. Dispositivos de aspiração/propulsão

Os sistemas de fluxo desenvolvidos usavam, como dispositivo de propulsão/aspiração uma bomba peristáltica Gilson MiniPlus 3, equipada com tubos de impulsão de cloreto de polivinilo (PVC), da mesma marca. A escolha do diâmetro interno do tubo de impulsão era efetuada tendo em consideração o caudal de propulsão pretendido e os volumes de solução a aspirar. Os tubos eram substituídos assim que se detetavam sinais de mau funcionamento tais como alterações do caudal, perda de elasticidade ou irreprodutibilidade dos sinais analíticos. Os tubos de impulsão foram calibrados através do cálculo da variação de volume aspirado ou propulsionado, por pesagem (1). A diferença obtida após pesagem de um goblé com água, previamente tarado, sujeito a aspirações ou propulsões a partir da válvula seletora, permitia obter uma relação entre tempo e caudal, definindo-se o volume a aspirar ou propulsionar, em termos de tempo. Este procedimento foi realizado sempre que necessário. O sentido do fluxo (aspiração ou propulsão) e a velocidade de rotação da bomba peristáltica eram controlados por computador.

2.1.3.2. Dispositivo de seleção de fluidos

Como dispositivo seletor de fluidos usou-se uma válvula seletora de fluidos que possuía oito portas periféricas e uma central cuja intercomunicação era efetuada pela rotação de um alvéolo situado no rotor de politetrafluoroetileno (PTFE) da cabeça da válvula (Figura 2.1) da marca Crison. O rotor utilizado era do tipo bidirecional o que permitia que o acesso a cada uma das portas periféricas fosse efetuado no mais curto espaço de tempo. Esta válvula apresentava um canal central que a cada momento podia estar conectado com um dos 8 canais laterais, permitindo o direcionamento dos fluidos. As portas periféricas permitiam a entrada dos reagentes e amostras no sistema, sendo uma destas portas periféricas usadas para a ligação ao detetor. A porta central permitia a ligação entre o tubo de armazenamento e todos os outros canais situados nas portas periféricas (Figura 2.2).

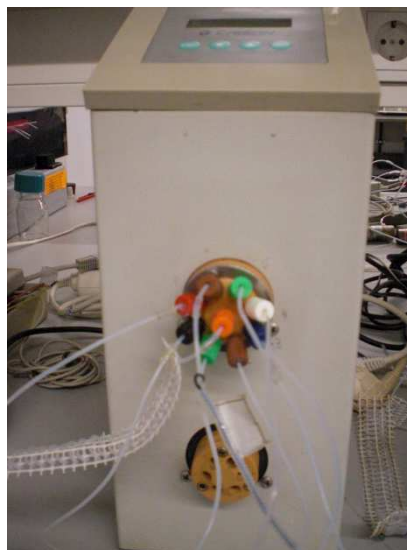


Figura 2.1 – Fotografia da válvula seletora de fluidos.

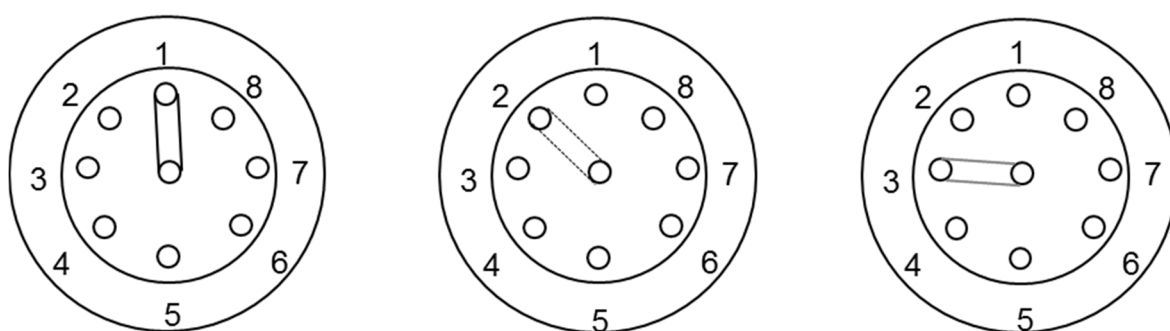


Figura 2.2 – Representação esquemática de três posições consecutivas da válvula seletora de fluidos.

2.1.3.3. Tubagem e outros componentes das montagens

O sistema de tubagem para o transporte das soluções era constituído por tubos de PTFE, da marca Omnifit, com diâmetro interno de 0,8 mm, ligados entre si por ligadores e terminais de fabrico próprio. Todos os tubos de armazenamento e reatores utilizados foram contruídos com PTFE tendo sido adotada uma configuração em oito, por enrolamento dessa forma ao longo de uma malha de plástico de 2 cm. Com esta configuração pretendia-se intensificar o transporte radial e diminuir o transporte laminar das soluções ao longo do percurso (2). Para a avaliação da toxicidade dos LIs e solventes orgânicos na atividade da aldolase (Capítulo 5) foi utilizada uma câmara de mistura de Perspex® (Figura 2.3), com

agitação mecânica, de volume interno regulável, através do ajuste da posição de uma peça móvel no topo das mesmas. A câmara era constituída por uma cavidade cilíndrica, perfurada na base em dois pontos diametralmente opostos, bem como no centro da peça móvel formando um canal para o exterior da câmara. Foi colocada sobre um agitador magnético que promovia a rotação de uma barra magnética colocada no seu interior. Nesta montagem, um dos canais da base da câmara foi obstruído com um ligador e como tal o líquido entrava pelo outro canal lateral emergindo pelo canal situado no topo da mesma.

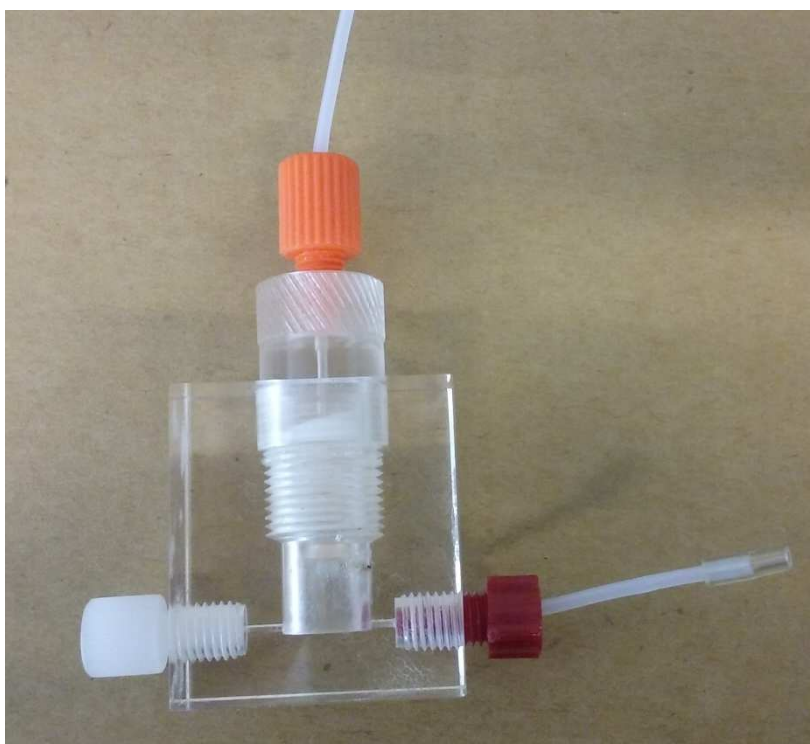


Figura 2.3 – Fotografia da câmara de mistura.

No trabalho descrito no Capítulo 6 a coluna usada como reator enzimático era fabricada em polimetilmetacrilato (PMMA). Em cada uma das extremidades da coluna, era colocado um filtro de polipropileno, da marca MoBiTec, com poros de 35 μm de diâmetro. Ambas as extremidades da coluna continham um sistema de rosca que permitia a ligação ao sistema de fluxo através de um ligador roscado convencional (Figura 2.4).



Figura 2.4 – Fotografia do reator enzimático.

2.1.4. Instrumentação

De acordo com a precisão necessária, todos os reagentes e amostras foram pesados numa das seguintes balanças analíticas Mettler Toledo (Mettler-Toledo International Inc., Columbus, USA) AG 285 (precisão de 1×10^{-5} g), Kern (Balingen, Germany) ABT 120-5 DM (precisão de 1×10^{-6} g), Kern 440-35N (precisão de 1×10^{-2} g) ou Kern ACJ/ACs 80-4 (precisão de 1×10^{-5} g).

Para a agitação das soluções foi utilizada uma placa de aquecimento e agitação da Falc-F60.

Na metodologia descrita no Capítulo 3, as determinações fluorimétricas eram feitas com recurso a um fluorímetro Jasco do modelo FP-2020/2025 Plus (Japan), equipado com uma célula de volume interno de 16 μ L.

Os sinais analíticos eram registados num registador da marca Linseis, modelo L250E9.

Nas metodologias descritas nos capítulos 4,5 e 6, as medições eram efetuadas num espectrofotómetro miniaturizado de fibras óticas Ocean Optics USB4000, equipado com uma fonte de tungsténio halogénio e um suporte de células CUV 1 (E. Duiven, Holanda), onde era colocada uma célula de fluxo com um percurso ótico de 1 mm, da marca Hellma, modelo 170.700-QS, (Mullheim, Baden, Alemanha). A fonte emissora e o espectrofotómetro estavam conectados ao suporte da célula através de fibras óticas simples, com 600 μ m de diâmetro (Ocean Optics, QP600-2-UV_BX).

O pH das soluções tampão utilizadas era medido num milivoltímetro da marca Crison Instruments, modelo GLP 22 equipado com um eléctrodo de vidro combinado de Ag/AgCl, da mesma marca e com a referência 52-02. A calibração do eléctrodo era realizada com os padrões comerciais pH= 4,00 (Riedel-deHaën, 33543), pH=7,00 (Riedel-deHaën, 33546) e pH= 9,00 (Merck, 9889).

Para o estabelecimento e manutenção da temperatura foi utilizado um banho termostatzado da marca Medingen E5.

Todas as medidas espectrofotométricas preconizadas pelos procedimentos de comparação para os parâmetros estudados foram efetuadas num espectrofotômetro UV/VIS Perkin Elmer λ 50 usando células de quartzo com 1 cm de percurso ótico (Hellma, ref. 6030-UV) e num espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 B usando células de quartzo com o mesmo percurso ótico (Hellma, ref. 104-QS).

2.1.5. Controlo informático dos sistemas

As metodologias baseadas na análise por injeção sequencial (SIA) assentam na atuação automática e sincronizada do dispositivo de aspiração/propulsão e dos dispositivos seletores de fluidos. Deste modo, estes componentes estavam conectados com um computador que se encontrava equipado com um cartão de interface Advantech PCL 711B e que, utilizando um programa elaborado em Microsoft QuickBasic 4.5, permitia o controlo destes dispositivos. As instruções do programa, visualizadas no ecrã do computador (Figura 2.5), referiam-se à escolha da posição da válvula seletora a aceder, ao tempo de permanência nessa posição (calculado a partir do volume de reagente/amostra aspirado ou propulsionado) e à velocidade e sentido de rotação da bomba peristáltica. Este programa permitia ainda definir a sequência de etapas necessárias em cada ciclo, assim como o número de repetições do mesmo, possibilitando deste modo a sincronização entre a bomba peristáltica e a válvula seletora de fluidos.

PROGRAMA DE CONTROLO DO SISTEMA SIA			
Posição	Tempo	Caudal	Sentido
(1 a 8)	(s)	(0 a 47)	(a/b)
Tempo	Posição		
Ciclo			
Alterar dados (s/n)?		<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Tempo Posição </div> <div style="text-align: center; padding-top: 10px;">Ciclo</div>	
Número de repetições do ciclo:			
Alterar quadro ou fazer um novo (a/n)?			

Figura 2.5 – Representação do programa de controlo informático do sistema SIA. Sentido (a/b) – sentido de aspiração/propulsão.

2.1.6.Desenvolvimento e otimização das montagens de fluxo

A otimização das montagens foi feita, tendo em conta diversos parâmetros, tais como a sensibilidade, a precisão, o limite de deteção, ritmo de amostragem e consumo de amostras e reagentes. A escolha dos valores mais adequados para as variáveis em estudo em cada montagem foi efetuada pelo método univariante, com exceção do método desenvolvido no Capítulo 3, em que se recorreu à metodologia de superfície de resposta (RSM).

O método univariante consistia em fazer variar, num determinado intervalo, o parâmetro a otimizar, mantendo fixos todos os outros.

A metodologia de superfícies de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, permitem explorar (modelar e deslocar) o sistema até a sua otimização (3). A primeira etapa envolveu a seleção das variáveis independentes com efeitos mais significativos no sistema. Na fase seguinte fez-se o plano experimental e a execução dos ensaios de acordo com a matriz experimental selecionada (desenho composto central, tratamento matemático dos dados experimentais obtidos através do ajuste de uma função polinomial, avaliação do ajuste do

modelo, verificação da necessidade e a possibilidade de executar um deslocamento na direção da região ótima e finalmente a obtenção dos valores ótimos para cada fator estudado. Esta abordagem permite, com um número reduzido de ensaios, otimizar simultaneamente todas as variáveis e ainda fornecer informação sobre a interação entre as mesmas.

O ritmo de amostragem, expresso em número de determinações por hora, era calculado tendo em conta o tempo necessário para a realização de cada operação do ciclo analítico, nomeadamente a aspiração de reagentes para o tubo de armazenamento, a propulsão do fluxo no sentido do detetor e os períodos de paragem de fluxo.

O intervalo de concentrações em que se verificava uma relação linear entre a concentração da espécie e a medida a efetuar foi definido através do traçado de curvas de calibração, com soluções de concentração crescente da espécie a determinar, e pelo cálculo e análise do coeficiente de correlação (r).

O limite de deteção era considerado como o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável, era obtido através da seguinte equação:

$$LD = \frac{k \times \sigma_{\frac{y}{x}}}{b}$$

$\sigma_{Y/X}$ era o desvio padrão residual da curva de calibração, b era o declive em questão e $K \approx 3,3$ para um nível de confiança de 99,74%.

O limite de quantificação era considerado a mais pequena concentração medida a partir da qual a quantificação do analito é possível com uma determinada exatidão e repetibilidade, era obtido através da seguinte equação:

$$L.Q = \frac{10 \times \sigma_{\frac{y}{x}}}{b}$$

$\sigma_{Y/X}$ era o desvio padrão residual da curva de calibração e b era o declive em questão.

2.1.7. Tratamento estatístico dos resultados

A repetibilidade de cada metodologia era avaliada em termos de desvio padrão relativo, (RSD, do inglês “Relative Standard Deviation”), expresso em percentagem. Amostras, com diferentes concentrações da espécie a determinar, foram injetadas 10 vezes consecutivas, no sistema de fluxo, de forma a avaliar a repetibilidade da metodologia, ao longo de todo o intervalo de concentração linear.

A repetibilidade exprime a fidelidade de um método de ensaio em condições idênticas, ou seja, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra em condições tão estáveis quanto possível: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagente e num curto intervalo de tempo.

Para a avaliação do potencial efeito inibitório dos diferentes LIs e solventes orgânicos nas enzimas, foram efetuados ensaios com quantidades crescentes dos compostos em estudo sendo os resultados registados na forma de dose-resposta o que permitia a determinação do EC_{50} (concentração efetiva que causa uma diminuição em 50% da atividade enzimática). Os cálculos do EC_{50} foram realizados por meio de correlações polinomiais estabelecidas em ensaios de inibição para cada composto testado.

2.2. Referências bibliográficas

1. M V, MD LdC. Flow-injection analysis - Principles and Applications. Chichester: Ellis Horwood Limited. 1987:104.
2. JF V, GD M. Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis. Process Contr Qual. 1992;2:251-61.
3. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta. 2008;76(5):965-77.

CAPÍTULO 3

Avaliação da toxicidade de líquidos iônicos através de um ensaio automatizado de inibição da atividade da carboxilesterase humana

3.1. Avaliação da toxicidade de líquidos iônicos através de um ensaio automatizado de inibição da carboxilesterase humana

3.1.1. Introdução

As carboxilesterases (CE) encontram-se em organismos que vão desde as bactérias aos seres humanos e estão relacionadas com a desintoxicação de xenobióticos (1). Estas enzimas foram recentemente alvo de atenção quanto à sua aplicação em monitorização ambiental (2, 3). Certos autores referem que as informações obtidas a partir da inibição das CE são tão importantes quanto as fornecidas pela acetilcolinesterase, um biomarcador amplamente utilizado na avaliação da toxicidade de xenobióticos (4-7). A importância da CE na avaliação da toxicidade está relacionada com uma diminuição da sua atividade após exposição ao xenobiótico. Neste caso, em situações da exposição humana o mecanismo de desintoxicação não funcionará em pleno devido à inibição enzimática. Assim, a influência dos produtos químicos na atividade da CE *in vitro* pode ser da maior importância para prever a toxicidade de xenobióticos *in vivo* (8-12).

Neste contexto, desenvolveu-se uma metodologia de análise por injeção sequencial (SIA) para estudar a atividade da CE, como alternativa aos procedimentos discretos habitualmente utilizados, e aplicou-se no sentido de avaliar a toxicidade dos líquidos iônicos (LIs).

Este método tem como fundamento a hidrólise da ligação éster do acetato de 4-metil-umbeliferilo (MUA) pela enzima CE dando origem a um ácido carboxílico e um fenol, a 4-metil-umbeliferona que é um composto fluorescente. Assim o aumento da fluorescência corresponde a um aumento da atividade enzimática (13) (Figura 3.1).

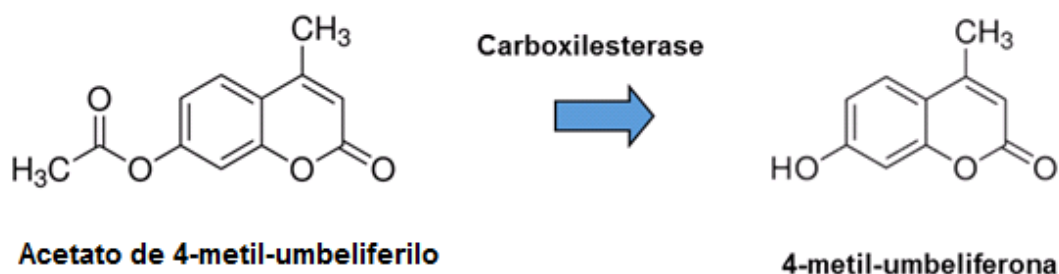


Figura 3.1 – Reação enzimática envolvida no ensaio de avaliação da actividade da carboxilesterase.

As determinações foram efetuadas em meio aquoso com concentrações crescentes de LIs: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [BF₄]), cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [Cl]), trifluorometanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [TfMs]), cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio (bmpyr [Cl]), metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ms]), metanosulfonato de tetrabutilfosfônio (tbph [Ms]), cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio (hmim [Cl]) (Figura 3.2), com o objetivo de ajudar na avaliação da possível toxicidade humana dos compostos estudados. Os resultados devem ser analisados em conjunto com mais resultados obtidos com diferentes enzimas ou organismos tendo como finalidade permitir uma compreensão mais abrangente da toxicidade dos LIs.

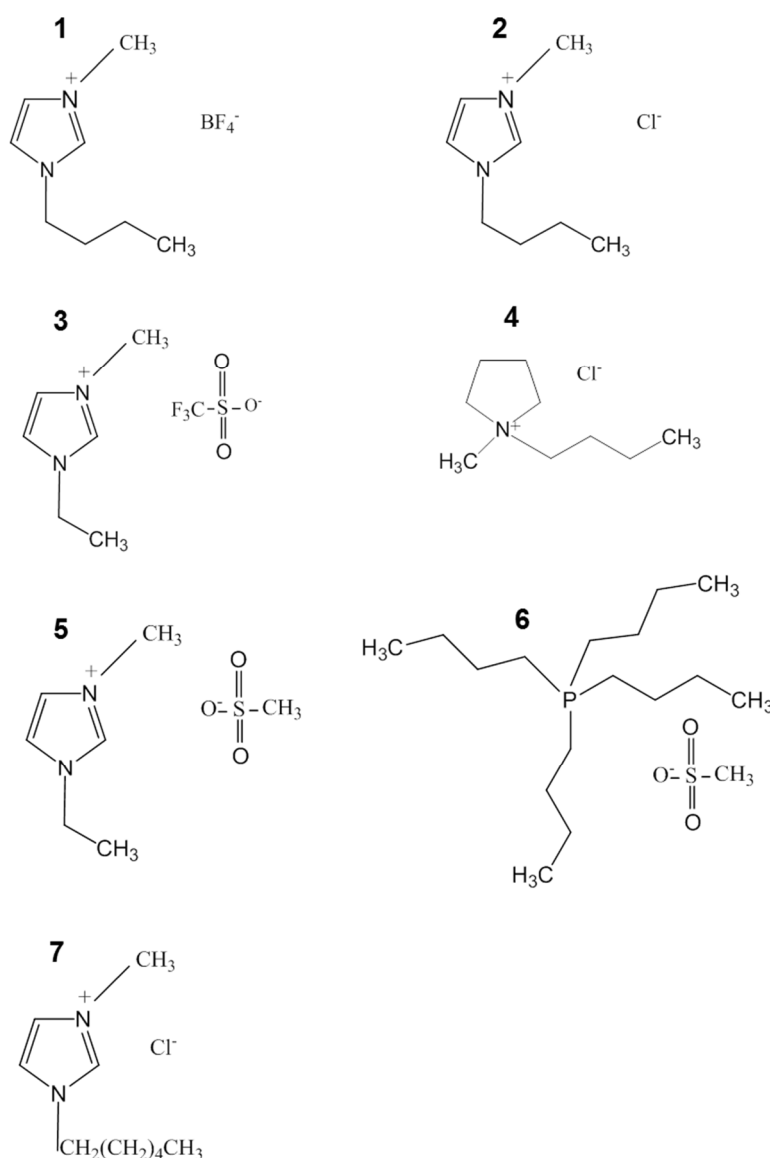


Figura 3.2 – Estrutura química dos LIs estudados. (1) (bmim [BF₄]), (2) (bmim [Cl]), (3) (emim [TfMs]), (4) (bmpyr [Cl]), (5) (emim [Ms]), (6) (tbph [Ms]), (7) (hmim [Cl]).

3.1.2. Materiais e métodos

3.1.2.1. Reagentes e soluções

A solução transportadora empregue no sistema SIA, desenvolvido para a avaliação da toxicidade dos LIs através da inibição da carboxilesterase, foi uma solução tampão Britton Robinson obtida por dissolução de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico com concentrações finais de $0,04 \text{ mmol L}^{-1}$. O pH desta solução foi ajustado a 8,0 unidades com uma solução de hidróxido de potássio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Uma solução padrão concentrada de MUA 10 mmol L^{-1} foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta solução foram preparadas soluções padrão de trabalho ($0,5\text{-}5 \text{ mmol L}^{-1}$) por diluição adequada em água ultra-pura.

Uma solução concentrada da enzima carboxilesterase humana 2 (EC 3.1.1.1), de 10 UG mL^{-1} , foi preparada por dissolução de uma quantidade apropriada da enzima liofilizada em tampão Britton Robinson e guardada a -70°C . Nos ensaios de inibição foi utilizada a solução de trabalho de $0,5 \text{ UG mL}^{-1}$ preparada no mesmo tampão. Nestes ensaios foram analisadas soluções de MUA 1 mmol L^{-1} com concentrações crescentes do LI em estudo. O Bis (p-nitrofenil) fosfato de sódio (BNPN) (Figura 3.3) foi determinado através do mesmo protocolo como um inibidor específico da carboxilesterase.

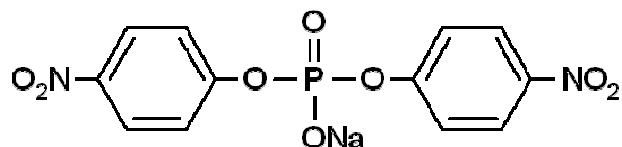


Figura 3.3 – Estrutura química do inibidor específico da carboxilesterase. Bis (p-nitrofenil) fosfato de sódio.

3.1.2.2. Aparelhagem

Os componentes constantes da montagem SIA (Figura 3.4), designadamente, bomba peristáltica, banho termostatizado, fluorímetro e registador, foram previamente descritos no Capítulo 2.

O tubo de armazenamento (TA) e o reator (RE) apresentavam comprimentos de 200 e 100 cm, respetivamente, ambos com configuração em figuras de oito.

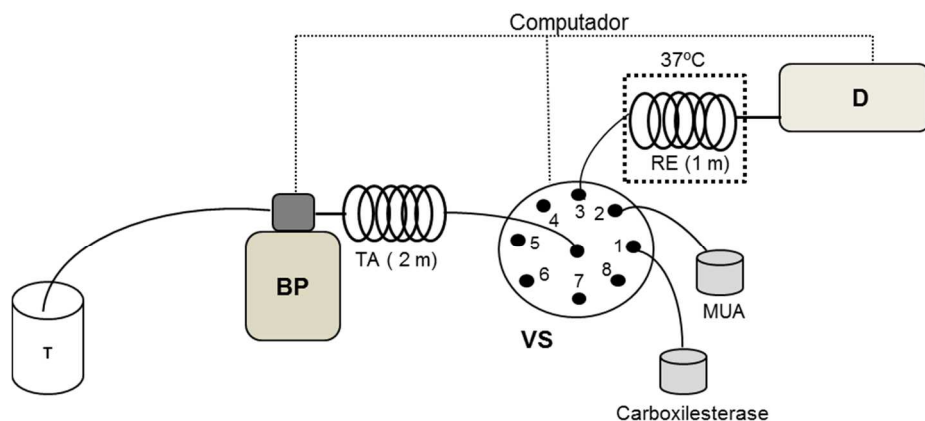


Figura 3.4 – Sistema SIA usado na determinação da atividade da carboxilesterase. T, transportador (Britton-Robinson 0,04 mM, pH 8); BP, bomba peristáltica; VS, válvula seletora de fluidos; TA, tubo de armazenamento (2m); RE, reator; D, detector.

3.1.2.3. Procedimento experimental

O ciclo analítico proposto para a avaliação da atividade da carboxilesterase (Tabela 3.1) foi iniciado com a aspiração de 25 μL de solução de carboxilesterase, para o tubo de armazenamento (etapa 1), seguida de aspiração de 100 μL de MUA (etapa 2). Estas alíquotas foram aspiradas a um caudal de 0,5 e 1 mL min^{-1} , respetivamente. Em seguida, a sequência de soluções aspirada foi, por inversão do sentido de fluxo, propulsão a um caudal de 1 mL min^{-1} para o reator, onde o escoamento foi interrompido por um período de 120 s (etapa 4). Finalmente, a zona de reação foi propulsão para o detector fluorimétrico a um caudal de 2 mL min^{-1} (etapa 5).

Tabela 3.1 – Protocolo analítico para a determinação da atividade da carboxilesterase

Etapa	Posição da válvula	Tempo de operação (s)	Caudal (ml min⁻¹)	Volume (µL)	Descrição
1	1	3	0,5	25	Aspiração da solução de carboxilesterase
2	2	6	1	100	Aspiração da solução de MUA
3	3	10	1	-	Propulsão do conteúdo do TA até ao reator
4	3	120	-	-	Período de paragem
5	2	60	2	2000	Aquisição do sinal analítico e propulsão do líquido transportador para lavagem da célula de fluxo

3.1.2.4. Desenho multifatorial

Neste trabalho recorreu-se a um planeamento experimental multifatorial – desenho composto central (CCD) – com vários objetivos: avaliar quais são as principais variáveis que afetam a atividade da enzima, mostrar as interações entre as variáveis e verificar a robustez do método na proximidade das condições ótimas. O CCD foi estabelecido com as seguintes variáveis: volume da enzima, volume de MUA e duração do período de paragem com os seguintes níveis ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$; com $\alpha=1,6818$). As condições experimentais estudadas foram as seguintes: 5/ 9/ 15/ 20 e 25 µL para o volume de enzima; 50/ 90,5/ 150/ 209 e 250 µL para o volume de MUA e 1/ 1,8/ 2/ 3/ 4,2 e 5 minutos para a duração do período de paragem.

Os ensaios foram efetuados num bloco com quatro pontos centrais, no total de 18 experiências. Foi utilizado o modelo de regressão quadrático para o ajuste da superfície/contorno. A resposta obtida para cada experiência foi registada na forma de intensidade de fluorescência (altura do pico). O erro experimental representado foi o Sum of Squares residual (SS residual). O desenho experimental foi produzido e analisado através do programa Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

3.1.3. Resultados e discussão

3.1.3.1. Otimização do ensaio de avaliação da atividade da carboxilesterase no sistema de fluxo

A primeira etapa do desenvolvimento deste trabalho teve como objetivo implementar o ensaio de avaliação da atividade enzimática no sistema SIA. O caudal de aspiração foi fixado em 1 ml min^{-1} e um reator com um comprimento de 1m foi colocado entre a válvula seletora e o detetor de fluorescência.

Teoricamente, as três principais variáveis que influenciam a atividade da carboxilesterase são: o volume de MUA, o volume da enzima e o tempo da reação. Desta forma, nos ensaios de otimização através do desenho composto central foram produzidas e analisadas as superfícies de resposta para determinar os valores ótimos das três variáveis: volume da enzima, volume de MUA e período de paragem.

Para avaliar o significado estatístico das três variáveis podem ser utilizadas duas estimativas do erro analítico: soma dos quadrados residual e o erro experimental ("pure error"). Neste caso foi utilizada a soma dos quadrados residuais dado que representa o pior cenário. O diagrama de Pareto dos efeitos principais, representado na Figura 3.5, permite visualizar a significância estatística ($p=0,05$) das variáveis e sua importância relativa no sistema, através da análise do efeito linear (L) ou quadrático (Q) assim como as interações entre as variáveis. Tal como pode ser observado, o volume da enzima (L) é o efeito mais importante no desempenho do método e é o único parâmetro linear com significância no nível 0,05, sendo que o parâmetro quadrático do volume da enzima também apresenta significância.

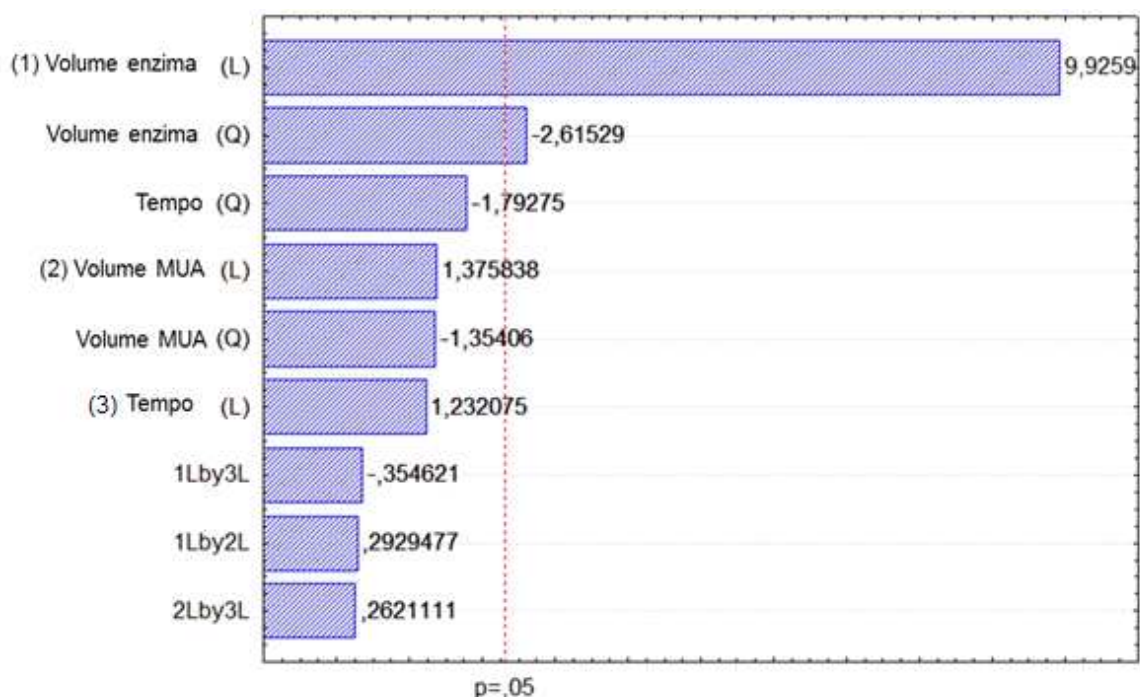


Figura 3.5 – Diagrama de Pareto com a representação dos efeitos do volume de MUA, volume de enzima e duração do período de paragem (tempo).

A mesma conclusão pode ser tirada da análise da superfície de resposta representada na Figura 3.6 (a). Este efeito é essencialmente linear e proporcionalmente positivo na resposta obtida até o valor de 22-25 μL , valor a partir da qual a resposta estabiliza. Desta forma, o valor de 25 μL foi considerado o ótimo para a metodologia. O diagrama de Pareto também evidência a importância do período de paragem, mas sem significado estatístico, tendo a resposta máxima sido atingida aos 2 minutos. O aumento do tempo de reação para além deste valor deu origem a sinais mais baixos e o consequente aumento do tempo da análise. Este comportamento pode ser verificado nas Figuras 3.6 (b) e (c). Foi então implementado um período de paragem de 2 minutos após a propulsão da zona de reação para o reator, posicionado entre a válvula seletora e o detetor. Da análise da superfície resposta de volume de MUA vs. volume de enzima, representada na Figura 3.6 (a) podemos concluir que o volume ótimo de MUA é 100 μL , uma vez que está em excesso relativamente à quantidade de enzima. De um modo geral, o método apresenta-se robusto na proximidade da resposta máxima, o que indica que pequenas variações na vizinhança do ponto ótimo não afetam grandemente a resposta do método.

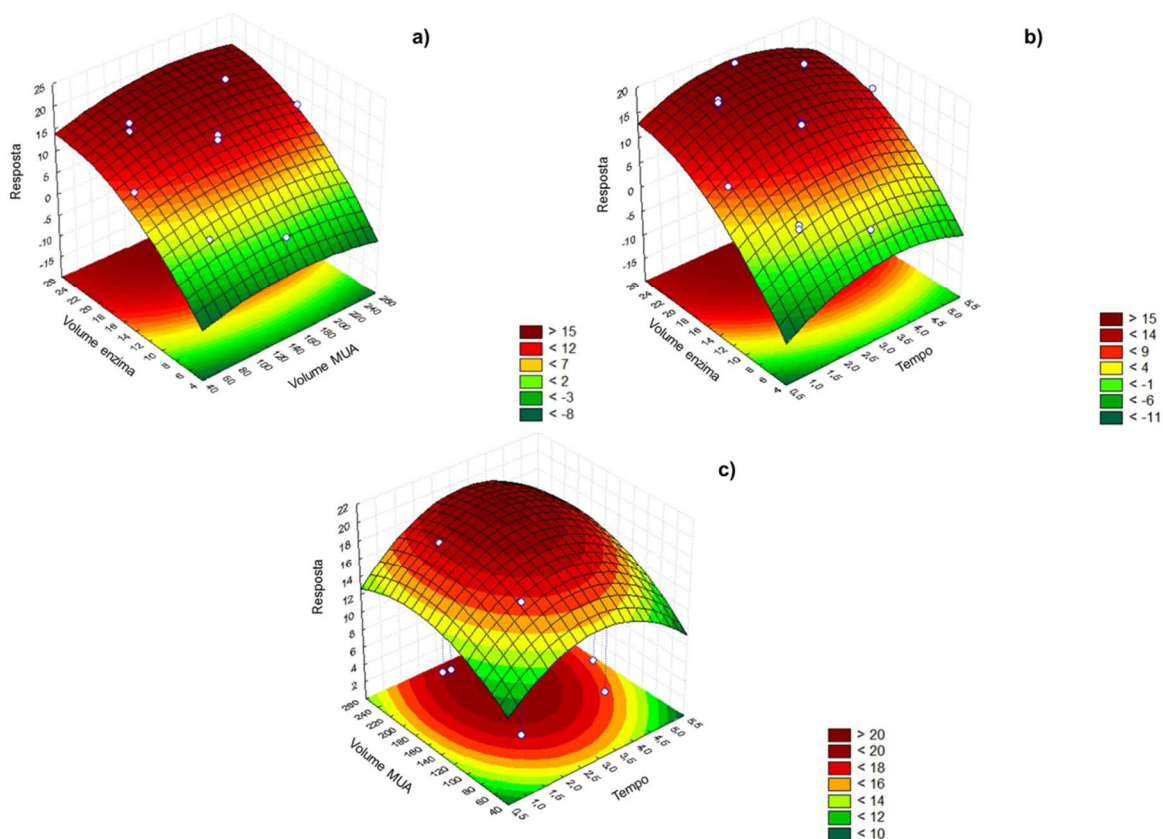


Figura 3.6 – Superfície de resposta de: (a) volume de enzima (μL) vs. volume de MUA (μL) com ajuste de tempo para 2 minutos, (b) volume de enzima (μL) vs. tempo (minutos) com volume de MUA ajustado para 100 μL e (c) volume de MUA (μL) vs. tempo (minutos) com volume de enzima ajustado para 25 μL .

As restantes variáveis, que afetam principalmente a dispersão (tais como: pH, caudal de propulsão e temperatura), foram otimizadas pelo método univariante. A ordem de aspiração dos reagentes e amostras constitui um fator importante que exerce influência sobre a amplitude do sinal analítico e dispersão (14). No presente trabalho os melhores resultados foram obtidos quando a enzima foi aspirada em primeiro lugar seguida pela alíquota de MUA.

A atividade da carboxilesterase é influenciada pelo pH (15), desta forma, foram efetuados ensaios com a solução transportadora com valores de pH entre 5,0 e 8,0 unidades, (Figura 3.7). Para valores de pH de 8,0 unidades verificou-se um aumento da resposta da enzima assim como uma diminuição da degradação do substrato. Desta forma, nos ensaios seguintes a solução tampão foi ajustada a esse valor de pH.

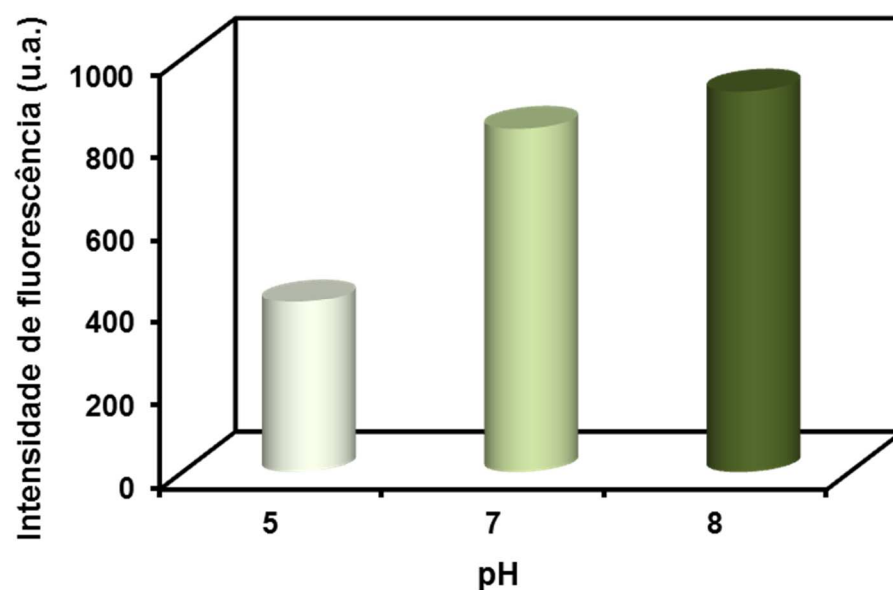


Figura 3.7 – Estudo do pH na otimização das condições experimentais.

Os caudais de propulsão foram testados entre os valores 1 e 2,5 mL min.⁻¹, tendo sido escolhido o valor de 1 mL min.⁻¹, pois para valores de caudais mais elevados verificou-se uma diminuição da atividade da enzima devido a uma diminuição de eficiência em termos de mistura. O efeito do caudal de propulsão após o período de paragem foi avaliado entre 0,5 e 2 mL min.⁻¹ e o valor selecionado foi de 2 mL min.⁻¹ pois permitia aumentar a intensidade do sinal analítico. O caudal de 2 mL min.⁻¹ evitava uma diluição excessiva do produto formado durante a propulsão da zona de reação para o detetor.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade da enzima foram efetuados ensaios a 25, 30 e 37°C, através do aquecimento do tubo de reação num banho de água com temperatura controlada, (Figura 3.8). Os resultados mostraram que a atividade da enzima aumenta com o aumento da temperatura. Desta forma, os estudos da atividade enzimática foram efetuados a 37°C. Temperaturas superiores não foram testadas devido à possibilidade de desnaturação da enzima. Por outro lado o aumento da temperatura poderia resultar na formação de bolhas de ar (no interior da tubagem do sistema) prejudicando a deteção do produto da reação.

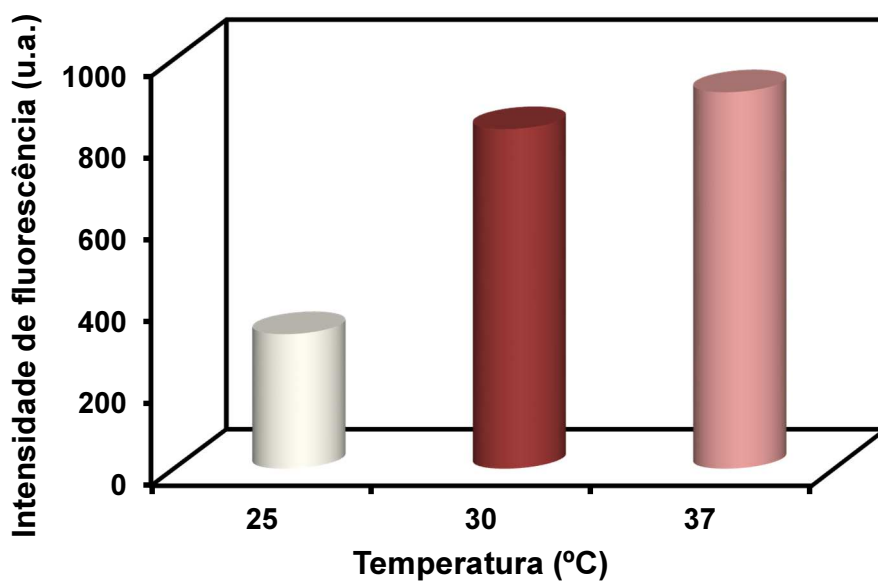


Figura 3.8 – Estudo da temperatura na otimização das condições experimentais.

Após a otimização do sistema, foram avaliados o intervalo de concentração linear, a sensibilidade e a repetibilidade da metodologia. A linearidade foi avaliada pela análise de cinco soluções de MUA com concentrações entre valores de 0,5 e 5 mmol L⁻¹, sendo o valor de R² da regressão linear sempre superior a 0,99 (Figura 3.9).

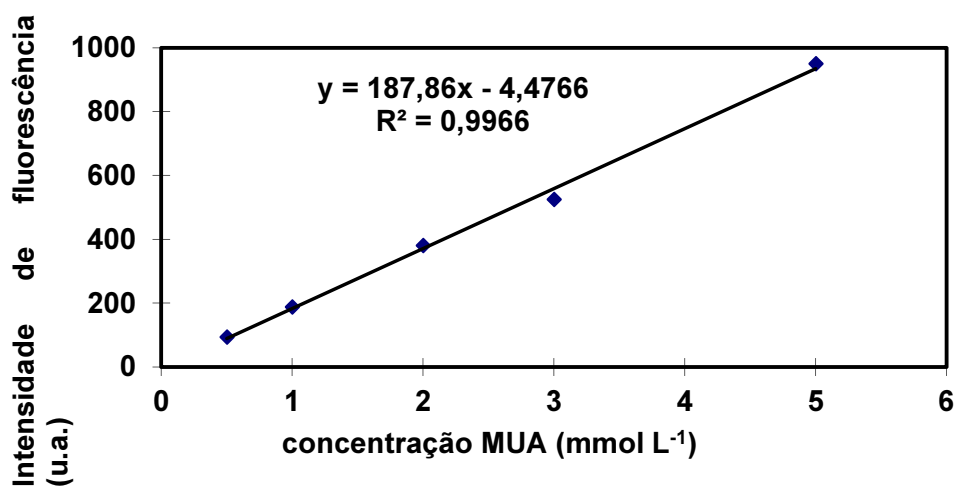


Figura 3.9 – Curva de calibração obtida com soluções MUA (0,5-5 mmol L⁻¹).

Os desvios padrão relativos (RSD%) calculados a partir da análise repetida (n=10) de soluções de MUA 3 e 5 mmol L⁻¹, foram inferiores a 5%.

3.1.3.2. Aplicação da metodologia desenvolvida à avaliação da toxicidade de líquidos iônicos

Neste trabalho, a atividade da carboxilesterase humana 2 foi avaliada na presença de sete LIs comerciais com o objetivo de prever a sua toxicidade a nível humano. Foram efetuados ensaios com soluções de substrato às quais eram adicionadas concentrações crescentes do LI em estudo. O efeito destas soluções na atividade da carboxilesterase foi avaliado através da metodologia desenvolvida (n=3; RSD < 4,3%). Os compostos selecionados apresentam estruturas químicas variadas com diferentes grupos estruturais o que determina comportamentos específicos.

A metodologia para avaliar a atividade da carboxilesterase baseia-se, como já referido, na hidrólise enzimática do MUA e a formação do 4-metilumbiliferona, um composto fortemente fluorescente ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$). Com o objetivo de uniformizar os resultados e evitar as pequenas flutuações diárias nos valores de fluorescência, os resultados dos ensaios de inibição com os LIs foram apresentados como atividade da carboxilesterase normalizada. O valor máximo de 1 foi definido como a atividade da carboxilesterase 0,5 UG mL⁻¹ em meio aquoso, na ausência do inibidor. Os valores de EC₅₀ para cada LI foram calculados como a concentração efetiva do inibidor que causa um decréscimo de 50% na atividade da carboxilesterase, o que corresponde a um valor de 0,5 da atividade normalizada da carboxilesterase. Os cálculos foram efetuados com recurso a correlações polinomiais estabelecidas nos ensaios de inibição para cada composto testado (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Toxicidade dos inibidores estudados expressa como EC₅₀.

Inibidor	Intervalo de concentrações (μmol L ⁻¹)	EC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
emim [Ms]	0-350	134
emim [TfMs]	0-220	127
bmim [BF ₄]	0-250	90
bmim [Cl]	0-220	121
hmim [Cl]	0-300	91
bmpyr [Cl]	0-100	55
tbph [Ms]	0-55	38
BNPN	0-30	12

Considerando a conhecida influência do grupo catiónico na toxicidade dos LIs, foram escolhidas três estruturas: imidazólio, fosfônio e pirrolídinio. Para avaliar a toxicidade intrínseca do anião foram selecionados os quatro aniões mais usuais: tetrafluoroborato [BF₄], cloreto [Cl], trifluorometanosulfonato [TfMs] e metanosulfonato [Ms].

Os dados obtidos permitiram traçar as curvas de inibição apresentadas na Figura 3.10 e calcular o EC₅₀, apresentado na Tabela 3.2., para cada LI estudado.

Com objetivos comparativos, a atividade da carboxilesterase também foi estudada na presença de bis(p-nitrofenil) fosfato de sódio (BPNB), um inibidor conhecido desta enzima (Figura 3.10, Tabela 3.2).

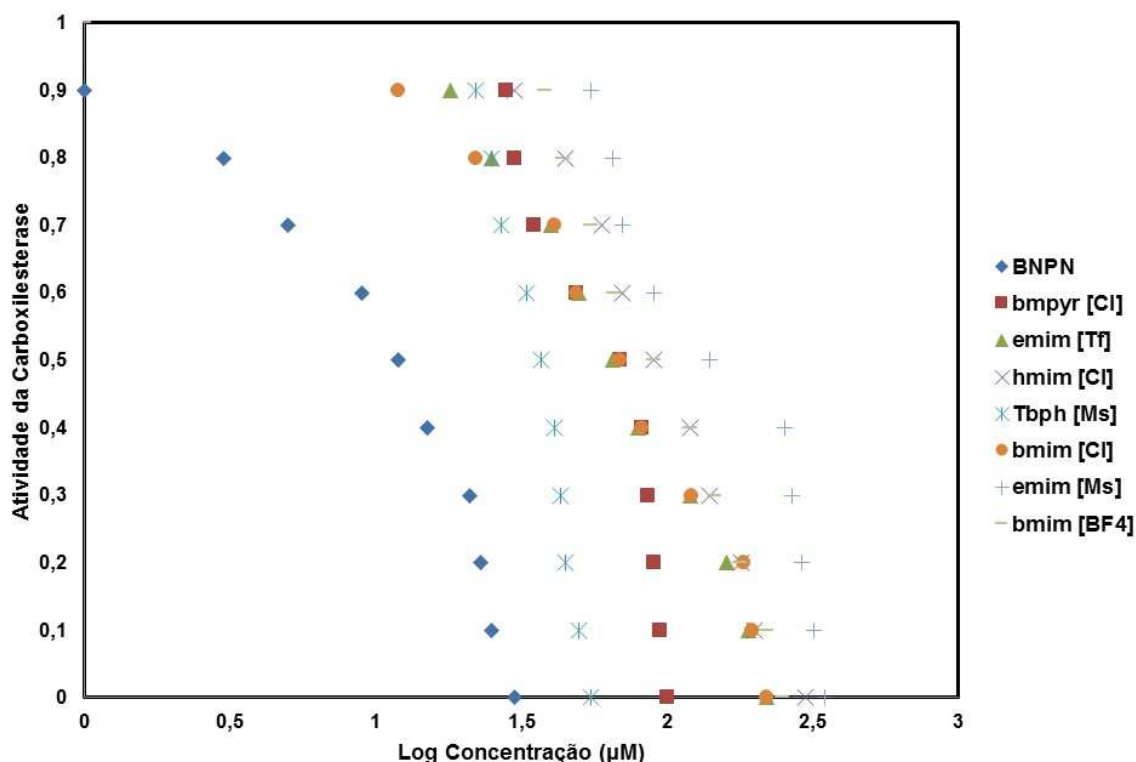


Figura 3.10 – Dados experimentais de toxicidade dos LIs estudados.

Os resultados obtidos, mostram que os LIs estudados apresentam um efeito de inibição da carboxilesterase inferior (entre 3 e 11 vezes) ao obtido para o BPNB. Os valores de EC_{50} variaram entre 38 e 134 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo de 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o BPNB.

Após análise do efeito do grupo catiónico, pode-se concluir que os LIs que apresentam grupos não aromáticos, como o pirrolidínio e fosfônio, apresentam baixos valores de EC_{50} (55 e 38 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respetivamente) comparativamente aos que apresentam grupos aromáticos como o butil-imidazólio e o etil-imidazólio como catiões, na presença do mesmo anião (bmim [Cl] = 121 $\mu\text{mol L}^{-1}$; emim [Cl] = 134 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Adicionalmente, a natureza do grupo do catião tetrabutílfosfônio, que exibe uma semelhança estrutural relativa aos surfactantes quaternários justifica parcialmente a tendência observada (16). Esta estrutura tem um comportamento químico e biológico semelhante aos surfactantes catiónicos, e são a classe mais tóxica deste grupo de compostos. Para além disto, alguns autores referem que os LIs com grupos pirrolidínios são potencialmente mais tóxicos do que os LIs com grupos imidazólios, o que está de acordo com a tendência observada (17).

O aumento da cadeia alquílica de 4 para 6 carbonos, nos LIs bmim [Cl] e hmim [Cl], resulta num aumento da inibição enzimática evidenciada pela diminuição do EC_{50} $\mu\text{mol L}^{-1}$

de 121 para 91 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estes resultados confirmam, numa pequena escala, que a toxicidade dos LIs do tipo imidazólio depende da sua lipofilia, que é maioritariamente determinada pelo comprimento da cadeia alquílica (e que rege a entrada da molécula através da membrana celular).

O efeito do anião na toxicidade dos LIs já foi previamente discutido e, excluindo alguns aniões com o grupo fluoreto, parece ser desprezável (18). Com os resultados obtidos nos ensaios efetuados, e apesar dos aniões estudados apresentarem baixa toxicidade, é possível efetuar algumas considerações baseadas nos diferentes aniões.

Pela comparação do comportamento do emim [TfMs] e emim [Ms] é possível concluir que estes dois aniões têm um efeito pouco significativo na atividade da carboxilesterase e deste modo, a toxicidade destes dois LIs está essencialmente relacionada com o grupo catiónico, já que apresentam valores muito semelhantes de EC_{50} (127 e 134 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respetivamente). É também possível concluir que o anião BF_4^- afeta a atividade da enzima, o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos para o bmim [BF_4] e bmim [Cl] (90 e 121 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respetivamente). Este resultado poderá estar relacionado com a hidrólise do BF_4^- nas condições do ensaio, com obtenção do ácido hidrofluorídrico que é reconhecidamente muito tóxico (19).

Estes resultados podem ser discutidos e interpretados tendo em consideração o mecanismo de atividade e inibição da carboxilesterase, assim como a sua estrutura e local ativo.

A carboxilesterase tem uma estrutura tridimensional e apresenta uma configuração conhecida como α/β hidrólase, sendo composta por várias α -hélices e folhas- β intercaladas. O seu sítio ativo é formado por uma tríade catalítica constituída por serina, histidina e glutamato ou aspartato. A tríade catalítica está localizada aproximadamente no centro da molécula e compreende uma larga bolsa flexível próximo do resíduo Ser203 e uma pequena bolsa rígida no local oposto. Tendo em consideração estas particularidades, os LIs estudados não estão incluídos no grupo de compostos que normalmente atuam como substratos ou inibidores desta enzima, tais como esteres ou amidas que potenciam a interação com o sítio ativo catalítico. Desta forma, pode-se supor que o mecanismo de inibição da carboxilesterase pelos LIs poderá ocorrer pela ligação dos mesmos tanto à bolsa pequena e rígida como à bolsa larga e flexível, dificultando a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima e reduzindo assim a sua atividade. Nesta perspetiva, é provável que os compostos com cadeias curtas, como o emim [Ms], emim [TfMs], bmim [BF_4], bmim [Cl] e bmpyr [Cl] se posicionem facilmente na bolsa pequena. Por outro lado, a bolsa maior flexível que está rodeada de vários resíduos não-polares pode acomodar grandes moléculas como o hmim [Cl] e o tbph [Ms].

3.1.4. Conclusões

A avaliação da toxicidade dos oito LIs comerciais pela metodologia desenvolvida é validada pela comparação dos resultados encontrados na literatura com a acetilcolinesterase, a enzima de eleição para este tipo de estudos.

Alguns autores referem valores de EC_{50} para o grupo imidazólio e pirrolídinio entre 34 e 105 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (20) (38 e 134 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pela metodologia desenvolvida), o que demonstra a semelhança na tendência de toxicidade com o método desenvolvido. Esta observação e comparação mostram que a inibição da atividade da carboxilesterase pode ser uma alternativa importante na avaliação da toxicidade de xenobióticos e em particular de LIs.

3.1.5.Referências bibliográficas

1. Satoh T, Hosokawa M. Carboxylesterases: structure, function and polymorphism in mammals. *Journal of Pesticide Science*. 2010;35(3):218-28.
2. Wheelock CE, Phillips BM, Anderson BS, Miller JL, Miller MJ, Hammock BD. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Rev Environ Contam Toxicol*. 2008;195:117-78.
3. Crow JA, Bittles V, Herring KL, Borazjani A, Potter PM, Ross MK. Inhibition of recombinant human carboxylesterase 1 and 2 and monoacylglycerol lipase by chlorpyrifos oxon, paraoxon and methyl paraoxon. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;258(1):145-50.
4. Torrecilla JS, García J, Rojo E, Rodríguez F. Estimation of toxicity of ionic liquids in Leukemia Rat Cell Line and Acetylcholinesterase enzyme by principal component analysis, neural networks and multiple lineal regressions. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;164(1):182-94.
5. Luo Y-R, Wang S-H, Yun M-X, Li X-Y, Wang J-J, Sun Z-J. The toxic effects of ionic liquids on the activities of acetylcholinesterase and cellulase in earthworms. *Chemosphere*. 2009;77(3):313-8.
6. Stock F, Hoffmann J, Ranke J, Stormann R, Ondruschka B, Jastorff B. Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase – a structure–activity relationship consideration. *Green Chem*. 2004;6:286-90.
7. Worek F, Wille T, Koller M, Thiermann H. Reactivation kinetics of a series of related bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase-structure–activity relationships. *Biochem Pharmacol*. 2012;83:1700-6.
8. Napierska D, Barsiene J, Mulkiewicz E, Podolska M, Rybakovas A. Biomarker responses in flounder *Platichthys flesus* from the Polish coastal area of the Baltic Sea and applications in biomonitoring. *Ecotoxicology*. 2009;18(7):846-59.
9. Mountassif D, Kabine M, Manar R, Bourhim N, Zaroual Z, Latruffe N, et al. Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vivo cytotoxicity assessment of metallic pollution: Impact on D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Ecological Indicators*. 2007;7(4):882-94.
10. Torre FRdl, Salibian A, Ferrari L. Enzyme activities as biomarkers of freshwater pollution: responses of fish branchial (Na plus K)-ATPase and liver transaminases. *Environ Toxicol*. 1999;14:313-9.

11. Jung JH, Hong SH, Yim UH, Ha SY, Shim WJ, Kannan N. Multiple in vitro bioassay approach in sediment toxicity evaluation: Masan Bay, Korea, Bull. Environ Contam Toxicol. 2012;89:32-7.
12. Frade RF, Afonso CA. Impact of ionic liquids in environment and humans: an overview. Hum Exp Toxicol. 2010;29(12):1038-54.
13. Wadkins RM, Hyatt JL, Wei X, Yoon KJP, Wierdl M, Edwards CC, et al. Identification and characterization of novel benzil (diphenylethane-1,2-dione) analogues as inhibitors of mammalian carboxylesterases. Journal of Medicinal Chemistry. 2005;48(8):2906-15.
14. JF v, GD M. Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis. Process Contr Qual. 1992;3:251-61.
15. Huang TL, Shiotsuki T, Uematsu T, Borhan B, Li QX, Hammock BD. Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of mammalian liver microsomal carboxylesterases. Pharm Res. 1996;13(10):1495-500.
16. Ivankovic T, Hrenovic J. Surfactants in the environment, Arh. Hig. Rada. Toksikol. 2010;61:95-110.
17. Arning J, Stolte S, Boschen A, Stock F, Pitner WR, Welz-Biermann U, et al. Qualitative and quantitative structure activity relationships for the inhibitory effects of cationic head groups, functionalised side chains and anions of ionic liquids on acetylcholinesterase. Green Chemistry. 2008;10(1):47-58.
18. Matzke M, Stolte S, Thiele K, Juffernholz T, Arning J, Ranke J, et al. The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco) toxicological test battery. Green Chemistry. 2007;9(11):1198-207.
19. Freire MG, Neves C, Marrucho IM, Coutinho JAP, Fernandes AM. Hydrolysis of tetrafluoroborate and hexafluorophosphate counter ions in imidazoliumbased ionic liquids. J Phys Chem A. 2010;114:3744-9.
20. Stock F, Hoffmann J, Ranke J, Stormann R, Ondruschka B, Jastorff B. Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase - a structure-activity relationship consideration. Green Chemistry. 2004;6(6):286-90.

CAPÍTULO 4

Avaliação da atividade da α -quimiotripsina em micelas mistas de brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) e líquidos iónicos: estudos cinéticos com recurso à análise por injeção sequencial

4.1. Avaliação da atividade da α -quimiotripsina em micelas mistas de brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) e líquidos iónicos: estudos cinéticos com recurso à análise por injeção sequencial

4.1.1. Introdução

Grande parte dos LIs usualmente aplicados são substâncias anfifílicas, constituídas por uma parte apolar e por uma parte polar. Este duplo carácter anfifílico confere-lhes uma tensão superficial e uma capacidade de se auto-organizarem espontaneamente ou formarem agregados em solução aquosa, usualmente designados por micelas. Quando presentes em baixas concentrações, o composto encontra-se na forma de monómero e favorece a disposição à superfície, mas à medida que a concentração aumenta, a superfície fica saturada e as moléculas organizam-se na forma de micelas (1-4). Esta concentração é designada por concentração micelar crítica (CMC). Adicionalmente os LIs podem ser adicionados como co-surfactantes ou hidrótrofos a soluções aquosas de surfactantes comuns, alterando as suas atividades superficiais e a CMC (5-11). Trabalhos prévios mostram que os LIs podem formar micelas mistas com os surfactantes comuns e as propriedades das micelas mistas resultantes dependem fortemente da relação surfactante/LI. Desta forma, as principais características dos agregados micelares como a CMC, número de agregação ou tamanho das micelas podem ser alteradas pela associação de LIs com hidrofobicidade adequada. Na literatura é possível encontrar informação sobre a influência dos LIs nas propriedades do dodecil sulfato de sódio (7, 8) e brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) (12, 13), entre outros (14).

Neste contexto, pretendeu-se avaliar a influência de micelas mistas de surfactante/LI na atividade da α -quimiotripsina (α -CT). Esta enzima é uma serina-protease muito estudada e a sua estrutura e mecanismo de ação são bem conhecidos. É responsável por catalisar reações de transesterificação com análogos de aminoácidos aromáticos (15). Esta particularidade obrigou ao estudo da atividade da α -CT em solventes alternativos tendo sido demonstrado que a enzima mantém a sua atividade numa grande variedade de solventes orgânicos (16). Vários trabalhos têm mostrado a capacidade de diferentes surfactantes catiónicos em ativar e estabilizar a α -CT (17).

A atividade da α -CT foi também estudada em diversos LIs graças às semelhanças com os solventes orgânicos hidrofílicos convencionais, em termos de polaridade, e às vantagens associadas ao uso de LIs em biocatálise, nomeadamente o aumento da solubilidade de substratos e produtos bem como o aumento da eficácia da reação. Os resultados destes estudos são muito promissores já que se verificou uma ativação e estabilização da enzima nesses solventes (18-20). Tendo em conta os fatores

mencionados e considerando as propriedades das micelas mistas de surfactante/LI, estes agregados parecem ser um meio reacional interessante para biotransformações catalisadas pela α -CT.

Desta forma, foi desenvolvida uma metodologia cinética baseada na análise por injeção sequencial para a avaliação da atividade da α -CT em micelas mistas de CTAB e LIs contendo os catiões do grupo imidazólio, piridínio e pirrolidínio.

No presente trabalho, a avaliação da atividade enzimática no meio reacional de micelas mistas contendo concentrações variáveis dos LIs selecionados, foi efetuada através dos parâmetros cinéticos da hidrólise da N-succinil-fenilalanina-p-nitroanilida (SPpNA) catalisada pela α -CT, que dava origem a um composto amarelo (p-nitroanilida) mensurável a 410nm.

4.1.2. Materiais e métodos

4.1.2.1. Reagentes e soluções

A solução de transporte empregue na metodologia desenvolvida era a solução tampão tris(hidroximetil)aminometano-HCl (Tris-HCl) 100 mmol L⁻¹. O pH desta solução era ajustado a 7,7 unidades com uma solução diluída de HCl.

Os LIs testados foram obtidos na Sigma-Aldrich: bmim [Cl] (cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio) e na Fluka: bmpyr [Cl] (cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio), hmim [Cl] (cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio) e bmpy [Cl] (cloreto de 1-butil-4-metilpiridínio).

Todos os LIs eram guardados à temperatura ambiente em ambiente anidro.

As micelas mistas eram preparadas com brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) 2 mmol L⁻¹ com concentrações variáveis de cada líquido iónico (0,10-1,0 mol L⁻¹). Diariamente, era preparada uma solução de α -CT de pâncreas de bovino, tipo II (EC 3.4.21.1, Sigma) com a concentração de 20 μ mol L⁻¹ em tampão ou em CTAB/IL para a formação de micelas mistas.

A solução padrão concentrada de (SPpNA) 25 mmol L⁻¹ era preparada diariamente em solução tampão. As soluções de trabalho com concentrações entre 0,25 e 5 mmol L⁻¹ eram preparadas por diluição da solução concentrada em tampão.

4.1.2.2. Aparelhagem

Os componentes constantes da montagem (Figura 4.1), designadamente, bomba peristáltica, e detetor, foram previamente descritos no Capítulo 2.

O tubo de armazenamento (TA) e o reator (R) apresentavam comprimentos de 200 e 100 cm, respetivamente, ambos com configuração em figuras de oito.

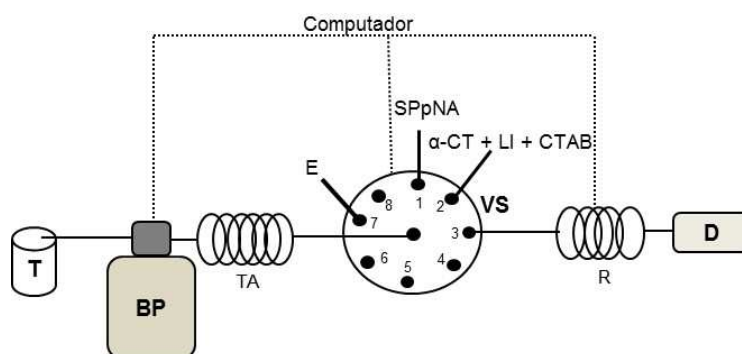


Figura 4.1 – Sistema SIA usado na determinação da atividade da α -CT. T, transportador (Tris-HCl, pH 7,7); BP, bomba peristáltica; VS, válvula seletora de fluidos; TA, tubo de armazenamento; R, reator; D, detetor; E, esgoto.

4.1.2.3. Procedimento experimental

O ciclo analítico proposto para estudo da cinética da atividade da α -CT, no sistema SIA está sumariado na Tabela 4.1. Inicialmente, o substrato e a enzima (em micelas mistas) eram aspirados para o tubo de armazenamento (etapa 1 e 2). Após inversão do sentido de fluxo, as zonas de reação eram propulsadas através do tubo de reação para a célula do detetor durante um tempo pré-estabelecido (etapa 3) A zona de reação permanecia na célula de fluxo durante 240 segundos (etapa 4); o composto formado p-nitroanilida (p-NA) era quantificado a 410 nm. O ciclo era concluído após a limpeza da célula de fluxo com solução transportadora (etapa 5).

Tabela 4.1 – Protocolo analítico para o estudo da atividade da α -CT

Etapa	Posição da válvula	Tempo de operação (s)	Caudal (ml min ⁻¹)	Volume (μ L)	Descrição
1	1	6	1	100	Aspiração do substrato
2	2	3	1	50	Aspiração do α -CT (em meio micelar)
3	3	60	1		Propulsão do conteúdo do TA até ao reator
4	3	240	0		Período de paragem com aquisição de sinal
5	3	85	1		Propulsão do transportador para lavagem da célula de fluxo

4.1.2.4. Determinação da velocidade inicial de reação

No período de paragem de fluxo, foi escolhido um intervalo de tempo fixo para aquisição de dados (80-240 segundos), durante o qual o declive da reta era calculado, avaliando-se assim a velocidade inicial de reação ($-dA/dt$).

As velocidades de reação (expressas em unidades de $\Delta UA\ s^{-1}$) eram calculadas segundo uma cinética de ordem zero através de uma regressão linear simples aplicando-se o método dos mínimos quadrados aos dados obtidos durante o período de tempo selecionado. Esta relação era considerada linear após inspeção visual dos gráficos (número de pontos superior a 50), e quando o coeficiente de correlação era superior a 0,995.

Os parâmetros cinéticos, constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{ap}) e a velocidade máxima (V_{max}^{ap}) foram obtidos através de uma regressão não linear do gráfico das velocidades iniciais ($V_0 - \Delta UA\ s^{-1}$) versus a concentração de substrato ($[S]$), utilizando o programa GraphPad Prism 6 para Windows. Os valores da constante catalítica (K_{cat}) também foram calculados. Cada valor apresentado representa a média de pelos menos três resultados experimentais em condições operacionais idênticas. A discrepância entre ensaios repetidos foi sempre inferior a 5%.

4.1.2.5. Caracterização das micelas mistas de CTAB/LIs

4.1.2.6. Determinação da concentração micelar critica (CMCs) de micelas mistas de CTAB/LI (dispersão de luz)

A determinação da concentração micelar critica foi efetuada por dispersão de luz (21). Os ensaios fluorimétricos foram realizados num espectralfluorímetro Perkin Elmer LS50B. Em todas as determinações o valor da fenda foi fixado em 3 nm e os comprimentos de onda de excitação e emissão em 400 nm. Os ensaios foram realizados em micelas mistas de CTAB (2 mmol L⁻¹) com concentração variável de LI (0,1-1 mol L⁻¹).

4.1.2.7. Determinação do tamanho das partículas

O tamanho das micelas foi determinado por ensaios de dispersão dinâmica de luz, do inglês “dynamic light scattering” (DLS) no analizador de partículas BI-MAS (Brookhaven Instruments, USA). As micelas mistas formadas por CTAB na concentração de 2 mmol L⁻¹ e bmim [Cl], bmpyr [Cl], hmim [Cl] e bmpy [Cl] nas concentrações entre 0,1 e 1 mol L⁻¹ foram analisadas e através do programa informático disponível correlacionava-se a intensidade de dispersão de luz com o raio hidrodinâmico da partícula esférica. Para cada amostra, a média do diâmetro ± o desvio padrão de pelo menos três determinações foi calculado com recurso à análise multimodal.

4.1.3. Resultados e discussão

Neste trabalho, a avaliação da actividade da α-CT foi implementada num sistema SIA. A atividade da enzima foi estudada em micelas mistas de CTAB e quatro LIs: dois com grupo imidazólio e diferentes comprimentos da cadeia alquílica: bmim [Cl] e hmim [Cl], um com grupo piridínio: bmpy [Cl] e outro com grupo pirrolídinio: bmpyr [Cl].

4.1.3.1. Otimização do sistema SIA

A atividade da α-CT foi avaliada através da reação de hidrólise de SPpNA com a formação de p-NA. A otimização do sistema foi feita através do método univariável. Os resultados foram analisados em termos de velocidade inicial da reação, expressa como ΔAs⁻¹.

O comprimento do reator, o caudal de propulsão, a sequência da aspiração, a composição e pH da solução tampão foram estabelecidas previamente tendo em consideração as particularidades do ensaio. Desta forma, um tubo reator de 2 m, em figura de 8, foi colocado entre a válvula seletora e o detetor de forma a possibilitar a sobreposição das zonas aspiradas no seu percurso até a célula de fluxo. O caudal de propulsão foi fixado em 1 ml min^{-1} no sentido de garantir o tempo suficiente para o início da reação antes da chegada da zona reacional à célula de fluxo. Quanto à ordem de aspiração, foi estabelecido que a alíquota da enzima seria aspirada imediatamente antes da inversão do fluxo no sentido de minimizar a sua dispersão. A utilização do tampão Tris-HCl 100 mmol L^{-1} com pH 7,7 na metodologia desenvolvida teve como base a sua descrição em trabalhos prévios (22, 23).

A gama dos parâmetros estudados e as condições finais selecionadas estão sumariadas na Tabela 4.2. Os volumes de SPpNA e enzima influenciavam a velocidade inicial da reação até 150 e 50 μL , respetivamente. O protocolo final envolveu a aspiração sequencial de 100 μL de SPpNA e 50 μL de enzima como um compromisso entre a sensibilidade e a sobreposição das zonas. De facto, ambos os volumes devem apresentar o valor menor possível tendo em consideração eventuais problemas de mistura devido à viscosidade das micelas mistas a serem testadas.

Tabela 4.2 – Resultados da otimização dos ensaios cinéticos da α -CT no sistema SIA

Parâmetro	Intervalo	Valor selecionado
Tempo de propulsão para o detetor (s)	57,5 – 62	60
Concentração da α -CT(μM)	5 – 50	20
Volume da α -CT(μL)	25 – 150	50
Volume de SPpNA (μL)	25 – 150	100

Nos ensaios cinéticos da metodologia SIA o transporte das zonas aspiradas para o detetor é de crucial importância para a implementação dos estudos de atividade enzimática pois define a porção da zona de reação que vai ficar aprisionada na célula de fluxo com a finalidade de monitorizar a reação. Neste trabalho, a escolha da zona de reação a monitorizar foi realizada através do estudo do tempo durante o qual essa zona de reação era enviada para o detetor, a 1 ml min^{-1} , antes da paragem do fluxo para aquisição do sinal. A velocidade inicial da reação aumentava com o tempo até ao valor de 60 segundos; para tempos superiores ocorria um decréscimo da taxa de reação o que indicava que a zona de reação estava a ser parcialmente enviada para o esgoto devido ao excessivo

tempo de propulsão (Figura 4.2). Assim, no protocolo final a propulsão da zona aspirada para a célula de fluxo era efectuada durante 60 segundos, a um caudal a 1 mL min⁻¹.

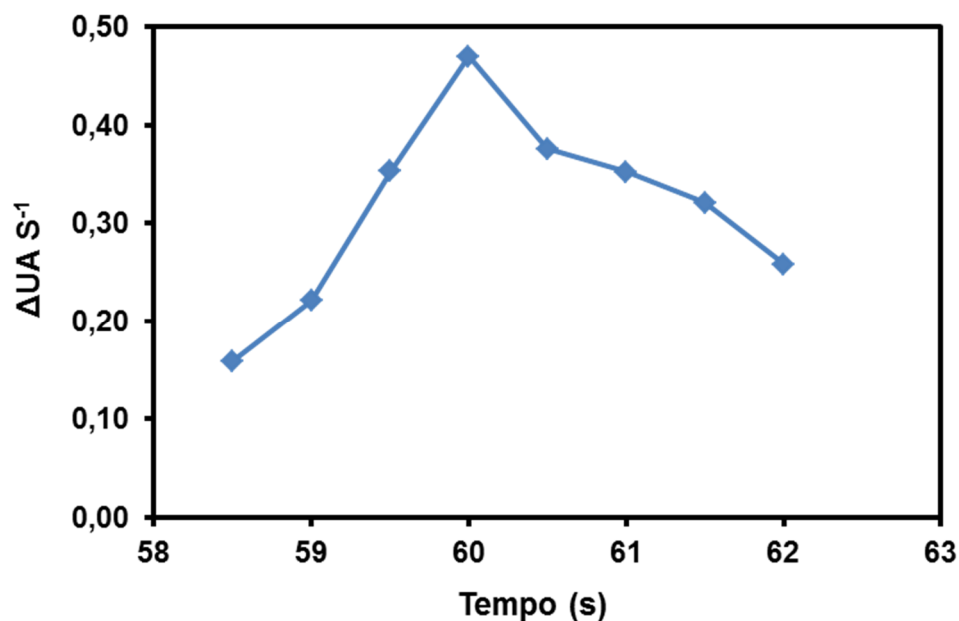


Figura 4.2 – Velocidade da reação ($\Delta\text{UA s}^{-1}$) ($n=3$; $\text{RSD} < 2,5\%$) obtida com SPpNA 2,5 mM para diferentes intervalos de tempo durante os quais o conteúdo do tubo de armazenamento era enviado para o detetor antes da aquisição do sinal.

Na otimização das condições experimentais a concentração da enzima foi estudada entre 5 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mantendo as condições experimentais descritas anteriormente. A velocidade de reação aumentava proporcionalmente com o aumento da concentração de enzima até 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e para concentrações superiores ocorria uma estabilização. Neste sentido e, tendo como pressuposto que uma cinética de ordem zero é atingida quando a concentração de enzima é limitante e que a velocidade de reação deve ser proporcional à concentração enzimática para o estabelecimento da cinética de Michaelis-Menten, foi selecionada a concentração de enzima igual a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.1.3.2. Características da micelas mistas CTAB/LI

A influência dos LIs na formação de micelas de CTAB foi estudada para diferentes combinações de surfactante-LI (Tabela 4.3). Esta influência foi avaliada em termos de concentração micelar crítica (CMC) que é a mínima concentração anfílica que conduz à formação de micelas em solução. Abaixo desta concentração o anfílico está presente em

solução como monómeros. A comparação dos valores de CMC mostrava que o CTAB tinha pouca tendência para agregar na presença de altas concentrações de LIs em comparação com soluções de concentração baixa ou soluções aquosas. Tal como se pode ver na Tabela 4.3, todos os LIs estudados reduziam significativamente a CMC, em baixas concentrações. Um aumento significativo da CMC foi observado para todos os LIs com concentrações acima de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, sendo esta tendência mais evidente nos LIs que contêm o catião pirídínio e pirrolidínio.

A discussão dos resultados obtidos deve ter em consideração a natureza iónica dos LIs assim como o seu efeito salino. No entanto, está referido que o efeito dos LIs em micelas pode envolver fenómenos distintos que dependem não só da natureza mas também da concentração do LI. Assim, tal como os sais comuns, os LIs podem atuar como eletrólitos reduzindo as interações de repulsão entre os grupos da cabeça do surfactante, com uma consequente estabilização das micelas e redução da CMC (6, 12). Neste trabalho, esta tendência foi observada para os LIs estudados em concentrações entre $0,1$ e $0,25 \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados obtidos podem ser suportados pela teoria de que os LIs mais hidrofóbicos podem também atuar como co-surfactantes ou infiltrarem-se como aditivos reduzindo a CMC, em concentrações baixas. De uma maneira geral, estes LIs atuam como co-solventes em concentrações altas, aumentando a CMC devido à baixa solvofobicidade entre o LI e a cauda hidrofóbica do surfactante, tal como foi observado com os LIs testados neste trabalho em concentrações acima de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Nestes casos, é possível que estes LIs, com altas concentrações, atuem como solventes polares, neste caso os iões negativos e positivos formam pares iónicos semelhantes aos solventes polares causando um aumento da CMC, pois a sua polaridade é mais fraca do que a água (6). Estes efeitos que envolvem o aumento da CMC são particularmente evidentes no caso do bmpy [Cl] e do bmpyr [Cl] com a concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com valores cerca de 2,5 vezes superiores aos obtidos com os LIs menos hidrofóbicos do grupo imidazólio.

O tamanho das micelas mistas de CTAB/LI estudadas está apresentado na Tabela 4.3. Pode confirmar-se que o tamanho das micelas aumentava com a presença de LIs confirmando que a adição de solventes pode atuar como um eletrólito comum em baixas concentrações, o que causa a redução da CMC e o aumento do tamanho. As variações no tamanho da cadeia aquilica não foram suficientemente expressivas para provocar diferenças significativas na média de tamanhos das micelas formadas pelos diferentes LIs.

Tabela 4.3 – Efeito dos LI nas características das micelas de CTAB

LI concentração (mol L ⁻¹)	CMC (mmol L ⁻¹)	Diâmetro da partícula (nm) ^a
0	1,0	0,7-2,5 ^b
hmim [Cl]-0,1	0,32	4,08 ± 0,80
hmim [Cl]-0,25	0,45	4,61 ± 0,79
hmim [Cl]-0,5	1,6	4,56 ± 0,83
hmim [Cl]-0,75	9,8	4,34 ± 0,88
hmim [Cl]-1	11,2	4,71 ± 0,82
bmim [Cl]-0,1	0,24	4,85 ± 0,78
bmim [Cl]-0,25	0,68	3,95 ± 0,72
bmim [Cl]-0,5	2,63	5,99 ± 1,08
bmim [Cl]-0,75	29,5	5,43 ± 1,04
bmim [Cl]-1	76,1	5,40 ± 0,81
bmpyr [Cl]-0,1	0,39	3,17 ± 0,60
bmpyr [Cl]-0,25	0,82	4,70 ± 0,86
bmpyr [Cl]-0,5	3,65	5,30 ± 0,89
bmpyr [Cl]-0,75	39,9	4,32 ± 0,79
bmpyr [Cl]-1	81,1	5,00 ± 0,91
bmpy[Cl]-0,1	0,64	4,06 ± 0,79
bmpy [Cl]-0,25	1,13	4,74 ± 0,83
bmpy [Cl]-0,5	3,17	3,42 ± 0,72
bmpy [Cl]-0,75	35,2	3,87 ± 0,78
bmpy [Cl]-1	95,8	4,10 ± 0,88

^aensaio com CTAB 2 mmol L⁻¹^b referências (12, 13)

4.1.3.3. Ensaios cinéticos em micelas de CTAB/LI

No presente trabalho, a influência das micelas de CTAB/LI no comportamento da α -CT foi testada no sentido de avaliar a possibilidade destas soluções serem usadas como meios reacionais em reações de transterificações catalisadas por esta enzima. A variação da velocidade inicial de reação com a concentração de substrato foi avaliada para concentrações de SPpNA entre 0,25 e 5,0 mmol L⁻¹. Os ensaios de cinética foram efetuados na presença de micelas formadas por CTAB na concentração de 2 mmol L⁻¹ e concentrações variáveis dos LIs selecionados (0-1 mol L⁻¹). Os resultados destes ensios

foram compilados graficamente (Figura 4.3) e os parâmetros críticos foram posteriormente calculados.

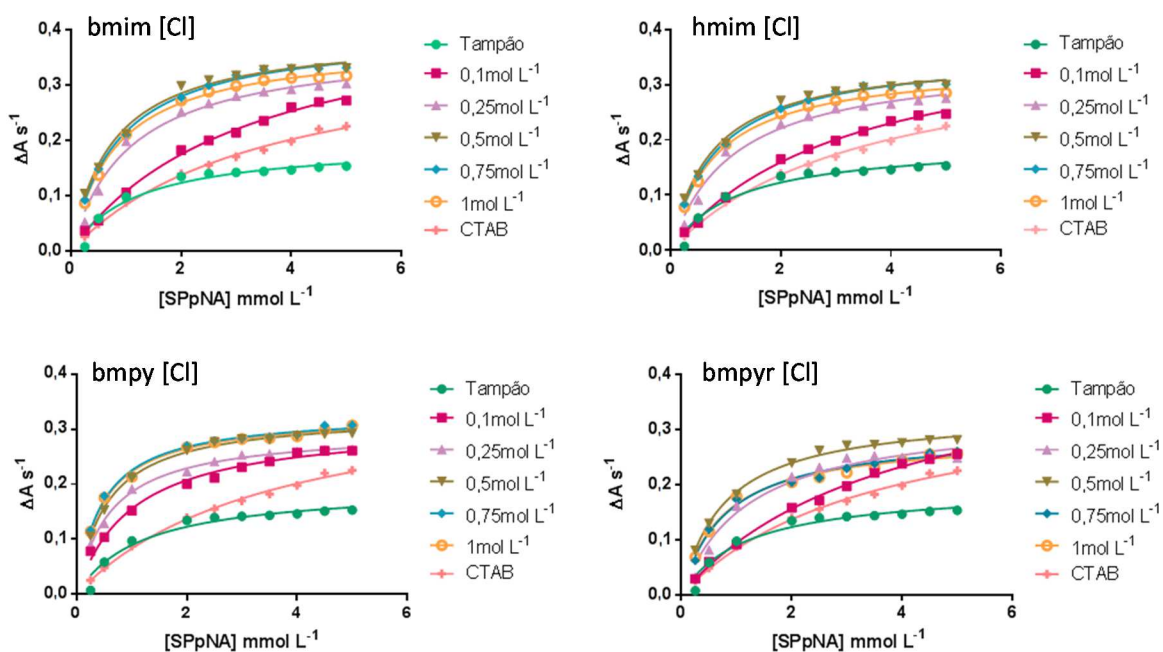


Figura 4.3 – Representação gráfica da variação da velocidade de reação obtida por aumento da concentração de bmim [Cl], hmim [Cl], bmpy [Cl] e bmpyr [Cl].

De um modo geral, foi observado um aumento significativo da eficiência catalítica de todos os LIs testados, para concentrações até 0,5 mol L⁻¹ (Figura 4.4).

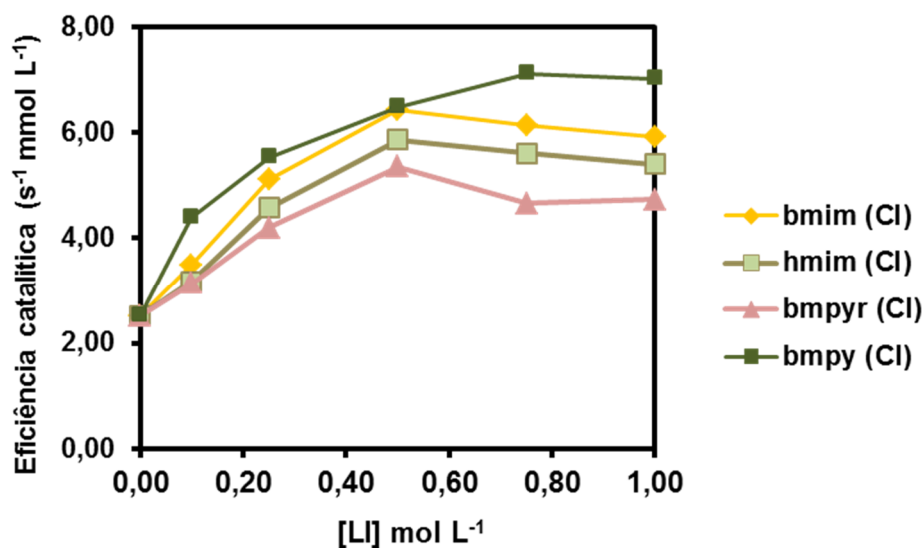


Figura 4.4 – Eficiência catalítica da α -CT em micelas mistas de CTAB/LI.

Antes da discussão dos resultados, é necessário referir que, tal como se pode concluir da análise das Tabelas 4.4-4.7, não existe formação de micelas na presença de todos os LIs com concentrações acima de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, dado que, nestas condições, a concentração de CTAB (2 mmol L^{-1}) é inferior à CMC calculada. Os ensaios foram efetuados com concentrações de LIs até $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, acima desta concentração os parâmetros cinéticos calculados refletem a interação da α -CT com monómeros de LI e micelas simples de CTAB.

Tabela 4.4 – Parâmetros cinéticos da α -CT em micelas mistas de CTAB/hmim [Cl].

Composição das micelas	K_M (mmol L^{-1})	K_{cat} (s^{-1})	Eficiência catalítica ($\text{s}^{-1} \text{ mmol L}^{-1}$)
Tampão	0,2962	0,7483	2,5263
CTAB 2 mmol L^{-1}	0,3593	0,9851	2,7417
CTAB 2 mmol L^{-1} + hmim [Cl] $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	0,2538	0,8065	3,1777
CTAB 2 mmol L^{-1} + hmim [Cl] $0,25 \text{ mol L}^{-1}$	0,1517	0,6942	4,5761
CTAB 2 mmol L^{-1} + hmim [Cl] $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	0,06175	0,3624	5,8688
CTAB 2 mmol L^{-1} + hmim [Cl] $0,75 \text{ mol L}^{-1}$	0,04502	0,2524	5,6064
CTAB 2 mmol L^{-1} + hmim [Cl] 1 mol L^{-1}	0,04374	0,2363	5,4024

Tabela 4.5 – Parâmetros cinéticos da α -CT em micelas mistas de CTAB/bmim [Cl].

Composição das micelas	K_M (mmol L ⁻¹)	K_{cat} (s ⁻¹)	Eficiência catalítica (s ⁻¹ mmol L ⁻¹)
Tampão	0,2962	0,7483	2,5263
CTAB 2 mmol L ⁻¹	0,3593	0,9851	2,7417
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmim [Cl] 0,1 mol L ⁻¹	0,3032	1,054	3,476
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmim [Cl] 0,25 mol L ⁻¹	0,1271	0,6489	5,1054
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmim [Cl] 0,5 mol L ⁻¹	0,06494	0,4170	6,4213
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmim [Cl] 0,75 mol L ⁻¹	0,04623	0,2836	6,1345
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmim [Cl] 1 mol L ⁻¹	0,03957	0,2343	5,9212

Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos da α -CT em micelas mistas de CTAB/bmpy [Cl].

Composição das micelas	K_M (mmol L ⁻¹)	K_{cat} (s ⁻¹)	Eficiência catalítica (s ⁻¹ mmol L ⁻¹)
Tampão	0,2962	0,7483	2,5263
CTAB 2 mmol L ⁻¹	0,3593	0,9851	2,7417
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmpy[Cl] 0,1 mol L ⁻¹	0,1096	0,4806	4,3850
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmpy[Cl] 0,25 mol L ⁻¹	0,03093	0,1708	5,5221
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmpy[Cl] 0,5 mol L ⁻¹	0,02384	0,1543	6,4723
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmpy[Cl] 0,75 mol L ⁻¹	0,03190	0,2265	7,1003
CTAB 2 mmol L ⁻¹ + bmpy[Cl] 1 mol L ⁻¹	0,02880	0,2018	7,0069

Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos da α -CT em micelas mistas de CTAB/bmpyr [Cl].

Composição das micelas	K_M (mmol L ⁻¹)	K_{cat} (s ⁻¹)	Eficiência catalítica (s ⁻¹ mmol L ⁻¹)
Tampão	0,2962	0,7483	2,5263
CTAB 2mmol L ⁻¹	0,3593	0,9851	2,7417
CTAB 2mmol L ⁻¹ + bmpyr [Cl] 0,1 mol L ⁻¹	0,3748	1,177	3,1403
CTAB 2mmol L ⁻¹ + bmpyr [Cl] 0,25 mol L ⁻¹	0,2391	1,005	4,2033
CTAB 2mmol L ⁻¹ + bmpyr [Cl] 0,5 mol L ⁻¹	0,04402	0,2358	5,3566
CTAB 2mmol L ⁻¹ + bmpyr [Cl] 0,75 mol L ⁻¹	0,07845	0,3655	4,6590
CTAB 2mmol L ⁻¹ + bmpyr [Cl] 1 mol L ⁻¹	0,08025	0,3801	4,7364

Neste contexto, tal como foi referido, o aumento da eficiência catalítica e o decréscimo do valor de K_M para concentrações de LI até $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ confirmaram que o fator mais relevante relacionado com a superatividade da enzima foi a interação com as micelas mistas (formadas com LI com concentrações abaixo de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Considerando que as variações observadas nos parâmetros cinéticos estão relacionadas com as micelas mistas, os resultados obtidos podem ser parcialmente explicados pelo efeito da concentração localizada dos reagentes causado pela partilha do substrato e troca iónica na interface, descrito em estudos anteriores da α -CT com surfactantes catiónicos (17, 24-26). Este fenómeno é o princípio básico da enzimologia micelar e neste caso foi confirmado pela observação do aumento do tamanho médio das micelas (Tabela 4.3) (12, 13, 27) que pode influenciar a enzima, assim como todo o meio envolvente. Este aumento na área de interface afetou a partilha do substrato e do produto induzindo alterações favoráveis no rendimento da reação. Além disso, alterações no tamanho podem também conduzir a alterações na orientação molecular ou na densidade molecular do substrato que podem melhorar as interações dinâmicas enzima-substrato. Interações específicas da enzima com o surfactante e as microinterfaces podem ser o aspeto relevante que afetou a eficiência enzimática, tal como referido noutros trabalhos (26). Considerando trabalhos anteriores que referem a atividade da α -CT em surfactantes catiónicos (17, 24, 25), é também possível que a incorporação dos LIs nas micelas seja responsável pela intensificação das interações favoráveis entre o grupo positivo (dos surfactantes e dos LIs) com a enzima o que levará a um aumento da atividade enzimática. É, também, possível que estas interações conduzam a uma conformação da enzima mais favorável.

O aumento da seletividade das reações enzimáticas nas micelas mistas indicou que nestas condições as ligações da enzima ao substrato são mais fortes atingindo-se a V_{\max} mais rapidamente. Estes resultados estão relacionados com efeitos conformacionais e de partilha resultantes das alterações no tamanho micelar médio induzido pelos LIs. As alterações discutidas estão de acordo com os resultados prévios obtidos com a β -galactosidase em micelas mistas de SDS/LI (14) e com a α -CT em surfactantes catiónicos (16).

O decréscimo do K_{cat} observado poderá estar relacionado com a diminuição da atividade termodinâmica do substrato resultante da sua incorporação na pseudo-fase micelar.

É interessante verificar que, após uma análise cuidadosa dos resultados obtidos, se verificou que mesmo nos casos em que as determinações eram efetuadas na presença de monómeros de CTAB e LI (LI com concentrações abaixo de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) a seletividade da enzima foi favorecida quando comparada com o ensaio na ausência de LIs. Estas

observações estão ilustradas nos resultados apresentados nas Tabelas 4.5-4.7 onde é notório um pequeno decréscimo do valor de K_M nos ensaios com LI abaixo de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. No entanto, nestes casos, a eficiência catalítica apresentou apenas uma pequena redução comparada com os ensaios com micelas mistas, sendo muito superior quando comparada com os ensaios na ausência de LIs. Considerando que estes resultados referem-se a ensaios executados na ausência de micelas mistas, estas observações são interessantes pois usualmente nestas concentrações os LIs são normalmente inibidores das enzimas (mas a um nível inferior em relação aos solventes orgânicos convencionais). Assim, concluiu-se que as micelas de CTAB presentes nestes ensaios, que se sabe que promovem um ambiente favorável para a α -CT, podem criar um ambiente adequado para a interação dos LIs com a enzima, facilitando a ligação com o substrato provocando um aumento da eficiência catalítica e da selectividade. De facto, em meio micelar, incluindo micelas reversas (28), as enzimas estão normalmente inseridas no interior da fase aquosa das micelas o que as pode proteger dos efeitos adversos dos solventes. Considerando todos estes aspetos, é possível que os LIs, presentes como monómeros abaixo de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ possam exprimir a sua elevada capacidade de estabelecerem ligações de hidrogénio, aumentando a nucleofilicidade da água na vizinhança da enzima, podendo ser considerado um fator importante para evitar alterações conformacionais da enzima (29).

4.1.4. Conclusões

A metodologia SIA proposta foi aplicada com sucesso à avaliação de atividade da α -CT, através da determinação de parâmetros cinéticos. Esta metodologia automática permitiu avaliar a atividade da enzima numa alargada gama de concentrações de LI usando um protocolo simples, com baixo consumo de reagentes e boa repetibilidade ($\text{RSD} < 5\%$, $n=5$), tendo em consideração a viscosidade das micelas mistas CTAB/LI. Os resultados mostram que as micelas mistas de CTAB/LI podem ser um meio reacional interessante para processos de catálise com a α -CT.

A análise dos parâmetros cinéticos indicam que a superatividade da enzima em meio de CTAB/LI, pode ser o resultado de uma conformação favorável da enzima e uma partilha adequada entre a enzima e o substrato. A utilização de micelas mistas de surfactante/LI, além de ser uma melhoria importante para reações de catálise enzimática estão de acordo com os princípios da Química Verde, pois existe substituição dos solventes orgânicos tóxicos e aumenta a atividade e seletividade da enzima.

4.1.5.Referências bibliográficas

1. Blesic M, Marques MH, Plechkova NV, Seddon KR, Rebelo LPN, Lopes A. Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution. *Green Chemistry*. 2007;9(5):481-90.
2. Anderson JL, Pino V, Hagberg EC, Sheares VV, Armstrong DW. Surfactant solvation effects and micelle formation in ionic liquids. *Chemical communications*. 2003(19):2444-5.
3. Jungnickel C, Luczak J, Ranke J, Fernandez JF, Muller A, Thoming J. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *Colloid Surface A*. 2008;316(1-3):278-84.
4. Luczak J, Hupka J, Thoming J, Jungnickel C. Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *Colloid Surface A*. 2008;329(3):125-33.
5. Smirnova NA, Vanin AA, Safonova EA, Pukinsky IB, Anufrikov YA, Makarov AL. Self-assembly in aqueous solutions of imidazolium ionic liquids and their mixtures with an anionic surfactant. *J Colloid Interf Sci*. 2009;336(2):793-802.
6. Shang YZ, Wang TF, Han X, Peng CJ, Liu HL. Effect of Ionic Liquids C(n)mimBr on Properties of Gemini Surfactant 12-3-12 Aqueous Solution. *Ind Eng Chem Res*. 2010;49(18):8852-7.
7. Behera K, Pandey S. Concentration-dependent dual behavior of hydrophilic ionic liquid in changing properties of aqueous sodium dodecyl sulfate. *The journal of physical chemistry B*. 2007;111(46):13307-15.
8. Behera K, Pandey S. Interaction between ionic liquid and zwitterionic surfactant: A comparative study of two ionic liquids with different anions. *J Colloid Interf Sci*. 2009;331(1):196-205.
9. Behera K, Kumar V, Pandey S. Role of the Surfactant Structure in the Behavior of Hydrophobic Ionic Liquids within Aqueous Micellar Solutions. *Chemphyschem*. 2010;11(5):1044-52.
10. Rai R, Baker GA, Behera K, Mohanty P, Kurur ND, Pandey S. Ionic Liquid-Induced Unprecedented Size Enhancement of Aggregates within Aqueous Sodium Dodecylbenzene Sulfonate. *Langmuir*. 2010;26(23):17821-6.
11. Beyaz A, Oh WS, Reddy VP. Ionic liquids as modulators of the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulfate. *Colloid Surface B*. 2004;35(2):119-24.
12. Rao VG, Ghatak C, Ghosh S, Pramanik R, Sarkar S, Mandal S, et al. Ionic Liquid-Induced Changes in Properties of Aqueous Cetyltrimethylammonium Bromide: A

Comparative Study of Two Protic Ionic Liquids with Different Anions. *J PhysChem B*. 2011;115(14):3828-37.

13. Javadian S, Ruhi V, Shahir AA, Heydari A, Akbari J. Imidazolium-Based Ionic Liquids as Modulators of Physicochemical Properties and Nanostructures of CTAB in Aqueous Solution: The Effect of Alkyl Chain Length, Hydrogen Bonding Capacity, and Anion Type. *Ind Eng Chem Res*. 2013;52(45):15838-46.

14. Pinto PCAG, Costa SPF, José L.F.C. Lima, Saraiva MLMFS. Galactosidase activity in mixed micelles of imidazolium ionic liquids and sodium dodecylsulfate: A sequential injection kinetic study. *Talanta*. 2012;96:26-33.

15. Illanes A. *Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications*. London: Springer Science+Business Media B. V; 2008.

16. Lozano P, deDiego T, Iborra JL. Influence of Water-Miscible Aprotic Solvents on α -Chymotrypsin Stability. *Biotechnol Progr*. 1996;12(4):488-93.

17. Verma SK, Ghosh KK. Effect of cationic surfactants on the enzymatic activity of α -chymotrypsin. *Kinet Catal*. 2011;52(1):6-10.

18. Laszlo JA, Compton DL. α -Chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnol Bioeng*. 2001;75(2):181-6.

19. Lozano P, Diego Td, Guegan JP, Vaultier M, Iborra JL. Stabilization of α -chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnol Bioeng*. 2001;75(5):563-9.

20. Diego TD, Lozano P, Gmouh S, Vaultier M, Iborra JL. Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the α -chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. *Biotechnol Bioeng*. 2004;88(7):916-24.

21. Reis S, Moutinho CG, Matos C, Castro Bd, Gameiro P, Lima J. Noninvasive methods to determine the critical micelle concentration of some bile acid salts. *Anal Biochem*. 2004;334(1):117-26.

22. Spreti N, Alfani F, Cantarella M, D'Amico F, Germani R, Savelli G. α -Chymotrypsin superactivity in aqueous solutions of cationic surfactants. *J Mol CatalB: Enzym*. 1999;6(1-2):99-110.

23. Spreti N, Mancini MV, Germani R, Di Profio P, Savelli G. Substrate effect on α -chymotrypsin activity in aqueous solutions of "big-head" ammonium salts. *J Mol Catal B-Enzym*. 2008;50(1):1-6.

24. Celej MS, D'Andrea MG, Campana PT, Fidelio GD, Bianconi ML. Superactivity and conformational changes on α -chymotrypsin upon interfacial binding to cationic micelles. *Biochem J*. 2004;378(3):1059-66.

25. Spreti N, Di Profio P, Marte L, Bufali S, Brinchi L, Savelli G. Activation and stabilization of alpha-chymotrypsin by cationic additives. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001;268(24):6491-7.
26. Spreti N, Alfani F, Cantarella M, D'Amico F, Germani R, Savelli G. α -Chymotrypsin superactivity in aqueous solutions of cationic surfactants. *J Mol Catal B: Enzym*. 1999;6(1-2):99-110.
27. Feitosa E, Brazolin MRS, Naal R, Lama MD, Lopes JR, W. Loh MV. Structural organization of cetyltrimethylammonium sulfate in aqueous solution: The effect of Na₂SO₄. *J Colloid Interface Sci*. 2006;299(2):883-9.
28. Carvalho CML, Cabral JMS. Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie*. 2000;82(11):1063-85.
29. Das D, Das D, Das PK. Improved activity of enzymes in mixed cationic reverse micelles with imidazolium-based surfactants. *Biochimie*. 2008;90(5):820-9.

CAPÍTULO 5

Avaliação dos líquidos iônicos como solventes alternativos para a aldolase: utilização de uma nova metodologia automática SIA na avaliação da sua atividade

5.1. Avaliação dos líquidos iônicos como solventes alternativos para a aldolase: utilização de uma nova metodologia automática SIA na avaliação da sua atividade

5.1.1.Introdução

A síntese orgânica industrial envolve normalmente o uso de compostos orgânicos voláteis (VOCs), que pode ocorrer em todo o processo de síntese ou apenas em etapas específicas tais como, a separação e purificação dos produtos sintetizados (1).

No entanto, os VOCs são por vezes difíceis de eliminar dos produtos finais sendo responsáveis por contaminações, neste caso são denominados como “solventes residuais” ou “impurezas de orgânicos voláteis”. Tendo em consideração a conhecida toxicidade associada aos VOCs e sendo a utilização destes solventes na indústria de síntese na ordem de 80-90% em massa, o uso destes solventes tornou-se uma séria preocupação tendo em consideração os princípios da “Química Verde” (2). Consequentemente, os fabricantes e entidades científicas desenvolveram esforços no sentido não apenas de minimizar o uso de VOCs na síntese industrial mas também na procura de solventes alternativos com menor impacto a nível ambiental e humano, assim como com reduzida influência nas propriedades dos produtos finais (3-5). A preocupação crescente gerada tanto a nível académico como industrial resultou já na tentativa de substituição dos VOCs pelos líquidos iônicos (LIs) na síntese orgânica (6-9). O aumento das aplicações dos LIs na química orgânica surge das suas propriedades favoráveis a nível físico-químico, tais como pressão de vapor negligenciável, boa estabilidade química e térmica e boas propriedades de dissolução tanto para compostos orgânicos como inorgânicos (6). Além disso, também é importante referir a capacidade demonstrada pelos LIs em alterar drasticamente o rendimento e seletividade das reações em química orgânica (8). De facto, os LIs podem ter impacto positivo na reatividade das espécies envolvidas na síntese orgânica que se deve a um equilíbrio no balanço entre as contribuições de entropia e entalpia envolvidas nas interações dentro dos LI e entre os iões e as espécies dissolvidas. Os LIs podem interagir com os solutos através de forças dipolares e de dispersão e atuar como forte aceitadores de ligações de hidrogénio (8). Os LIs podem também formar sistemas bifásicos com os VOCs clássicos o que permite uma simples separação dos produtos de reação através da extração da camada formada pelo LI.

No campo da síntese orgânica, os LIs têm sido também alvo da atenção como meio reacional enzimático de processos sintéticos com aumento na estabilidade enzimática, seletividade e melhoria do rendimento. Considerando que alguns processos industriais utilizam atualmente reações catalisadas por enzimas na produção em larga escala de

produtos químicos, este aspeto é muito relevante tanto numa perspetiva económica como de segurança. A aplicabilidade dos LIs em biocatálise tem sido explorada intensivamente através de estudos com várias enzimas na presença de LIs, apresentando estas estruturas variadas (10, 11). A polaridade dos LIs parece ser um dos fatores mais importantes que afeta a estabilidade e seletividade da enzima. A elevada polaridade permite a utilização de LIs como meio reacional para biotransformações de uma vasta gama de substratos, em especial os altamente polares tais como, os hidratos de carbono e os aminoácidos. Outros estudos revelam que a viscosidade dos LIs também tem um forte impacto na atividade enzimática (12), pois a elevada viscosidade pode reduzir a taxa de difusão das espécies envolvidas no processo devido a uma redução da interação entre enzima e o substrato, o que influencia negativamente o rendimento da reação. A viscosidade também dificulta a agitação e a homogeneização do meio reacional, o que torna lenta a dissolução de algumas substâncias.

A capacidade que os LIs apresentam em formar pontes de hidrogénio tem sido considerada muito importante para a estabilização proteica e manutenção da sua estrutura nativa (13). O usual desdobramento térmico das enzimas pode ser prevenido na presença de uma pequena quantidade de água, numa rede de pontes de hidrogénio formadas pelos LIs (14). A supressão de reações laterais devido à diminuição de água no meio reacional também tem sido associada com um aumento do rendimento das reações enzimáticas em meio de LIs (15).

No campo da síntese química, uma das abordagens mais atrativas são as reações aldol catalisadas por ácidos de Lewis quirais, que são consideradas reações importantes na formação de ligações C-C, e que são muito usadas na produção de hidroxiketonas frequentemente encontradas em compostos biologicamente ativos e em drogas. Consequentemente, o desenvolvimento de catalisadores para as reações aldol que controlem a estereoquímica das novas ligações C-C independentemente da estrutura da matéria-prima é da máxima importância. As aldolases são consideradas dos catalisadores mais promissores das reações aldólicas (16, 17). Esta enzima catalisa as reações formadas entre uma substância carbonílica enolizável que age como nucleófilo e outra substância carbonílica que age como eletrófilo. Como resultado da reação, obtém-se um produto β -hidroxialdeído que se denomina aldol. Uma vez que a unidade β -hidroxialdeído está presente em vários produtos naturais, a reação aldólica tem sido usada na síntese de substâncias com interesse a nível biológico (18). Usualmente estas enzimas apresentam alta especificidade em relação ao substrato dador e toleram uma ampla gama de substratos recetores, tornando-as uma ferramenta muito atrativa para sínteses assimétricas de vários compostos tais como hidratos de carbono, aminoácidos, e seus análogos (16, 19, 20).

Os processos sintéticos catalisados pela aldolase realizam-se normalmente com VOCs tais como, metanol ou dimetilformamida com os inconvenientes já mencionados (21, 22). Neste contexto, e tendo em consideração as vantagens da biocatálise em LIs, foi desenvolvida uma metodologia automática com base na técnica SIA para avaliar a atividade da aldolase em LIs e solventes orgânicos com o objetivo de escolher “solventes verdes” para sínteses com a aldolase.

As técnicas laboratoriais para a avaliação da atividade da aldolase desenvolvidas até ao momento aplicam-se fundamentalmente na análise de soros, envolvem procedimentos com diversos passos e operações (23) além disso utilizam várias enzimas (24, 25), o que inviabiliza a avaliação do efeito dos solventes apenas na atividade da aldolase. Assim, nesta metodologia explorou-se pela primeira vez, uma nova abordagem reacional, que se baseia na quebra da D-frutose-1,6-difosfato (DFDP) pela aldolase seguida de uma reação de oxidação entre o D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH) na presença de FeCl_3 .

O trabalho desenvolvido envolve um estudo comparativo da atividade da aldolase em solventes orgânicos: dimetilformamida e metanol e LIs, para avaliar uma alternativa aos solventes orgânicos convencionais nas sínteses orgânicas catalisadas pela aldolase.

5.1.2. Materiais e métodos

5.1.2.1. Reagentes e soluções

As soluções do ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfonato de sódio (MOPS), D-frutose-1,6-difosfato (DFDP), 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH), FeCl_3 , metanol, cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio (bmpyr [Cl]), cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio (hmim [Cl]), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [BF₄]), tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [BF₄]), acetato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ac]), cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [Cl]), trifluorometanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [TfMs]), metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ms]), acetato de colina (chol [Ac]) foram obtidas da Sigma-Aldrich Cooperation. Todos os líquidos iónicos analisados foram guardados, em ambiente anidro, à temperatura ambiente.

As soluções de DFDP (7-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$), MBTH 0,05% e a aldolase obtida do músculo do coelho (Sigma, EC 4.1.2.13) com a concentração de 1 mg mL^{-1} foram preparados diariamente por diluição na solução tampão (MOPS, 25 mM, pH 7). A solução de FeCl_3 0,1% era preparada diariamente em HCl 30 mmol L^{-1} .

Nos ensaios de inibição, as várias soluções de DFDP ($7\text{--}30\ \mu\text{mol L}^{-1}$) foram preparadas em solução tampão MOPS e na presença de dimetilformamida (Romil Chemicals), metanol (Atom Scientific), bmpyr [Cl], hmim [Cl], bmim [BF₄], emim [BF₄], emim [Ac], bmim [Cl], emim [TfMS], emim [MS] e chol [Ac] com concentrações finais de 5%, 20% e 50% (Figura 5.1).

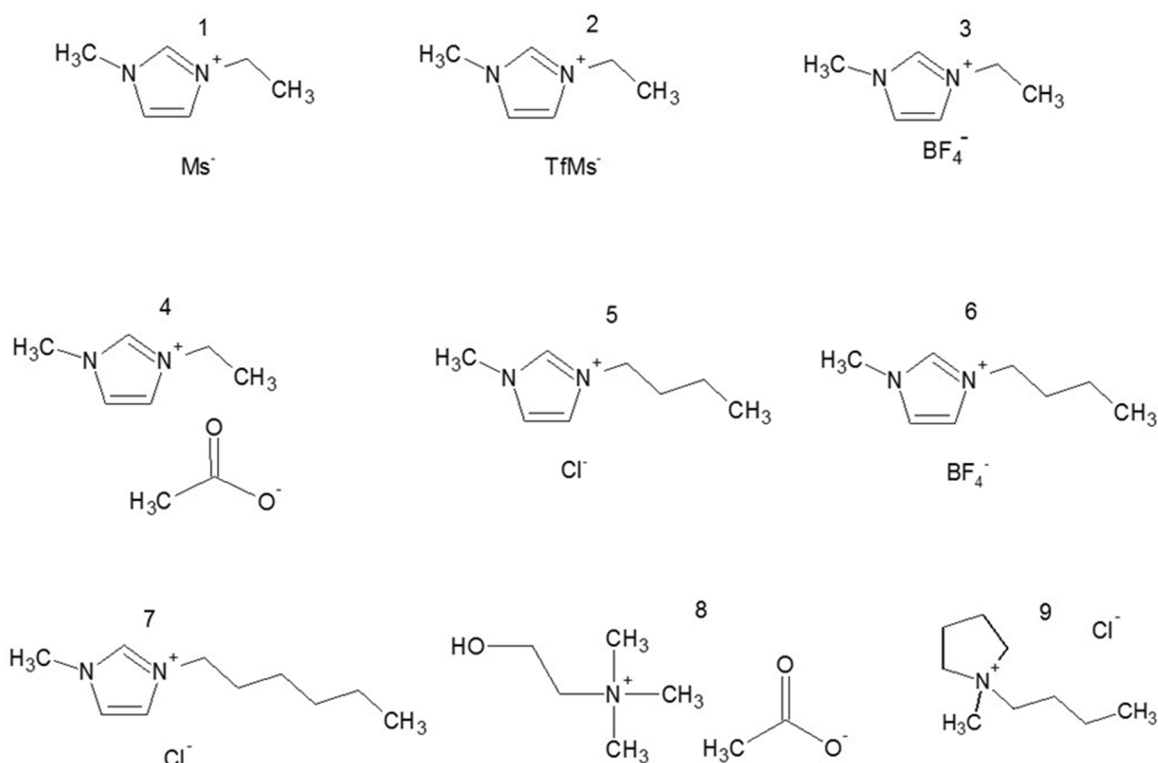


Figura 5.1 – Estrutura química dos LIs estudados. 1: metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ms]); 2: trifluorometanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [TfMs]); 3: tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [BF₄]); 4: acetato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ac]); 5: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [Cl]); 6: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [BF₄]); 7: cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio (hmim [Cl]); 8: acetato de colina (chol [Ac]); 9: cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio (bmpyr [Cl]).

5.1.2.2. Aparelhagem

O sistema de injeção sequencial apresentava na unidade propulsora um tubo de impulsão de PVC com 0,8 mm de diâmetro interno.

O tubo de armazenamento apresentava um comprimento de 200 cm, com configuração em oito.

A câmara de mistura estava colocada sobre uma placa magnética, termostatzada a 30°C.

As soluções MBTH e FeCl_3 estavam imersas num banho de água com a temperatura controlada de 30°C.

Todos os outros componentes constantes da montagem (Figura 5.2), designadamente, bomba peristáltica, válvula, câmara de mistura e o detetor, foram previamente descritos no Capítulo 2.

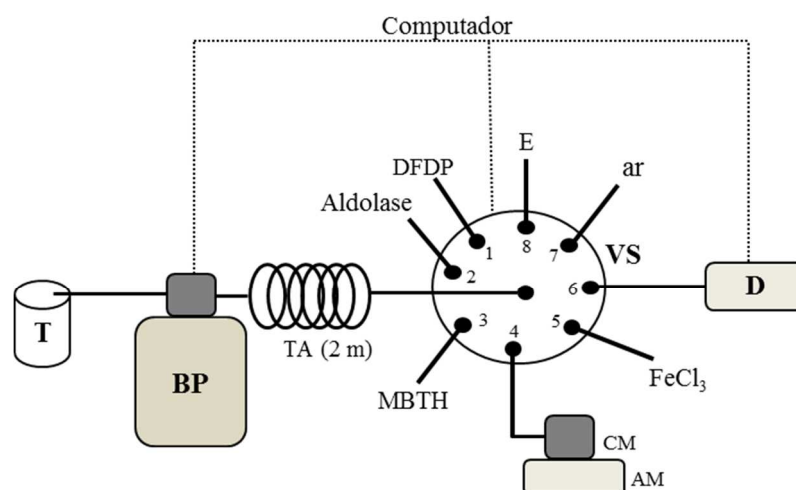


Figura 5.2 – Sistema SIA usado na determinação da atividade da aldolase. T, transportador (MOPS 25 mM, pH 7); BP, bomba peristáltica; VS, válvula seletora de fluídos; TA, tubo de armazenamento (2m); CM, câmara de mistura; AM, agitador magnético; D, detetor; E, esgoto.

5.1.2.3. Procedimento experimental

O ciclo analítico proposto para a determinação da atividade da aldolase está apresentado na Tabela 5.1 e era composto por 18 etapas. O ciclo começava com a aspiração de uma bolha de ar (etapa 1), seguido de aspiração de 100 μL de DFDP e 10 μL

de aldolase (etapas 2 e 3). A sequência aspirada era, após a inversão do fluxo, propulsionada para a câmara de mistura (etapa 4) onde o fluxo permanecia parado durante 180 segundos (etapa 5). Subsequentemente, 100 μL de MBTH, precedido por uma bolha de ar (etapa 6 e 7), era também propulsionado para a câmara de mistura onde o fluxo era parado (etapa 8 e 9). Depois, 100 μL de FeCl_3 (precedido por uma bolha de ar) era aspirado e propulsionado para a câmara de mistura onde o fluxo era parado (etapa 10-13). Seguidamente, uma alíquota da câmara de mistura era aspirada para o tubo de armazenamento (etapa 14) e subsequentemente propulsionada para o detetor onde o sinal proporcional à atividade da enzima era medido (etapa 15).

O ciclo analítico terminava com a lavagem e esvaziamento da câmara de mistura (etapa 16-18), de modo a que no ciclo seguinte não se encontrassem na câmara vestígios da mistura reacional da determinação anterior. A lavagem compreendia uma etapa em que a solução transportadora era propulsionada para a câmara a um caudal elevado, saindo pelo canal de esgoto (etapa 16). Na etapa seguinte, procedia-se ao esvaziamento da câmara por aspiração da solução transportadora que permaneceu no seu interior (etapa 17). Na etapa 18, a solução aspirada da câmara era direcionada para uma porta de esgoto, de modo a garantir que toda a tubagem estivesse preenchida apenas com a solução transportadora.

Recorrendo à metodologia otimizada avaliou-se a atividade da aldolase em meio aquoso e na presença de dois solventes orgânicos convencionais (metanol e dimetilformamida) e nove LIs comerciais. Para isso, a determinação era implementada nas mesmas condições mas utilizava-se soluções de DFDP ($7\text{--}30\ \mu\text{mol L}^{-1}$) com concentrações variáveis dos solventes selecionados (5%, 20% e 50%).

Tabela 5.1 – Procedimento analítico para o estudo da atividade da aldolase.

Etapa	Posição da válvula	Volume (μL)	Caudal (mL min^{-1})	Tempo (s)	Descrição
1	7		0,5	1	Aspiração de uma bolha de ar
2	1	100	1	6	Aspiração de DFDP
3	2	10	0,5	1,2	Aspiração da aldolase
4	4		1	13	Propulsão da sequência para a CM
5	4			180	Período de paragem
6	7		0,5	1	Aspiração de uma bolha de ar
7	3	100	1	6	Aspiração de MBTH
8	4		1	12	Propulsão da sequência para a CM
9	4			120	Período de paragem
10	7		0,5	1	Aspiração de uma bolha de ar
11	5	100	1	6	Aspiração de FeCl_3
12	4		1	12	Propulsão da sequência para a CM
13	4			300	Período de paragem
14	4	374	1,5	15	Aspiração da mistura da CM
15	6		3	25	Propulsão da mistura para o detetor
16	4		3	60	Limpeza da CM com o transportador
17	4		1	30	Aspiração do transportador da CM
18	8		3	20	Propulsão do transportador para o esgoto

5.1.3. Resultados e discussão

O estudo da atividade da aldolase foi realizado através de uma reação modelo, a quebra de DFDP pela aldolase e a reação oxidativa entre o G3P e MBTH na presença de FeCl_3 , com a monitorização do composto formado, a 610 nm.

5.1.3.1. Otimização do sistema SIA

Os estudos iniciais foram efetuados somente em meio aquoso e pretendiam otimizar os procedimentos enzimáticos e recolher dados para comparação. Assim, a otimização tinha como objetivo maximizar a atividade enzimática.

A primeira etapa do desenvolvimento deste trabalho envolveu a implementação de uma reação dividida em duas fases, a quebra do DFDP pela aldolase e a ligação oxidativa entre o aldeído formado e o MBTH na presença de FeCl_3 , no sistema SIA.

Considerando as particularidades das duas etapas desta metodologia, nomeadamente a degradação enzimática do substrato e a detecção espectrofotométrica do aldeído formado, foi incorporada uma câmara de mistura no sistema de fluxo no sentido de criar as melhores condições para a automatização da metodologia com uma sensibilidade adequada. Esta opção promove a implementação de três períodos de paragem do fluxo (Tabela 5.1, etapas 5, 9 e 13) e a mistura adequada das diferentes soluções enquanto permite um controlo da temperatura das reações que decorrem na câmara.

Com o objetivo de controlar a dispersão das soluções aspiradas, foi implementado a estratégia de fluxo monosegmentado através da inserção de uma bolha de ar antes da aspiração do substrato e aldolase, MBTH e FeCl_3 (26).

A mono-segmentação é uma importante estratégia de amostragem em SIA uma vez que permite um controlo da dispersão das zonas aspiradas através da limitação do contacto com a solução de transporte recorrendo a bolhas de ar (27). Neste trabalho, e como as sequências das zonas aspiradas eram obtidas de forma altamente reprodutíveis, era possível interromper o fluxo logo após a entrada na câmara de mistura da última bolha de ar, desta forma evita-se assim uma dispersão excessiva e uma diluição e garantia-se que a alíquota era na sua totalidade inserida na câmara de mistura. As bolhas eram eliminadas para o esgoto através de um orifício existente na parte superior da câmara de mistura.

Nos ensaios que têm como base uma reação enzimática, a quantidade de substrato que se irá ligar ao local ativo da enzima é determinante tanto para o desempenho da enzima como para a sensibilidade da determinação. Assim, foram testados volumes entre 50 e 150 μL de DFDP e foi escolhido o volume de 100 μL , pois para volumes superiores a quantidade de enzima mostrou-se insuficiente e a sensibilidade diminuiu enquanto que para volumes inferiores o sinal analítico diminuiu, provavelmente devido a uma quantidade insuficiente de substrato.

O volume da aldolase foi estudado na gama entre 10 e 20 μL e foi observado que os sinais analíticos aumentavam até o volume de 20 μL . No entanto, as diferenças

registadas (apenas de 10% entre o volume de 20 μ L e 10 μ L) não justificavam o uso de volumes elevados e desta forma foi escolhido o volume de 10 μ L para os restantes ensaios.

A primeira etapa da reação, baseada na interação do substrato com a aldolase origina fosfato de dihidroxiacetona e D-gliceraldeído 3-fosfato. Tal como referido na introdução, a atividade da aldolase é normalmente avaliada através de métodos que têm como base múltiplos passos e operações e ensaios que envolvem mais do que uma enzima (28, 29). O método mais usual recorre a três enzimas (aldolase, triose-fosfato isomerase e glicerofosfato desidrogenase e deteção espectralométrica (28, 29), o que dificulta o estudo do efeito dos solventes em cada enzima específica. Como o objetivo principal deste trabalho era avaliar a atividade da aldolase na presença de solventes orgânicos e LIs, era necessário encontrar uma reação alternativa que não envolvesse as outras duas enzimas permitindo assim o estudo da influência dos solventes exclusivamente na aldolase. Para isso, a segunda etapa dos ensaios de atividade, que normalmente envolve a triose-fosfato isomerase e glicerofosfato desidrogenase, é substituída por uma reação oxidativa que origina um aldeído (D-gliceraldeído 3-fosfato) com formação de um produto corado que pode ser medido espectralometricamente. A reação oxidativa implementada baseia-se no uso do MBTH, que é um conhecido reagente de aldeídos, e na presença de FeCl_3 (Figura 5.3.) (30). Esta reação envolve três etapas, em que as duas primeiras etapas ocorrem simultaneamente através da reação do MBTH com o aldeído formado, dando origem a uma azida (C), e com o FeCl_3 dando origem a um catião reativo (corante tetrazopentametincianina, D). A terceira etapa da reação envolve a combinação da azida (C) com o catião reativo e formação de um composto corado azul, o formazana (E) que é detetado espectralometricamente. Neste contexto, é fácil perceber que a concentração do MBTH é extremamente importante para maximizar a sensibilidade, pois de acordo com o mecanismo da reação, este é o reagente principal para a sequência das reações que permitem a deteção do aldeído formado através da atuação da aldolase (Figura 5.3). No sentido de estabelecer a concentração ótima de MBTH a ser utilizada no ensaio, foram testadas concentrações entre 0,05% e 0,085%. As diferenças obtidas para concentrações elevadas (apenas de 1,5% entre 0,05% e 0,085%) não foram significativas e desta forma, nos ensaios posteriores foi escolhida a concentração de 0,05%. Uma gama de concentrações similares foi testada para o FeCl_3 e os melhores resultados em termos de sensibilidade foram obtidos com 0,1%. Para concentrações de FeCl_3 superiores a 0,1% as soluções obtidas apresentavam-se turvas. Para aumentar a solubilidade era necessário ajustar o valor de pH o que poderia influenciar de forma negativa a atividade da enzima.

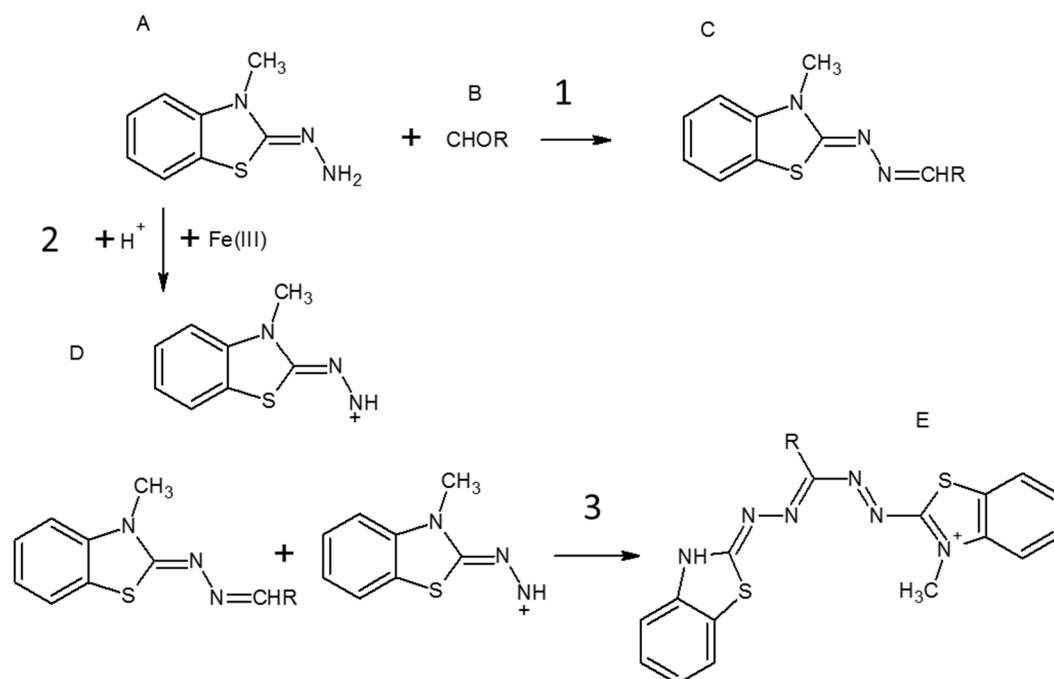


Figura 5.3 – Representação esquemática da reação espectrofotométrica da determinação do aldeído formado pela degradação do DFDP pela aldolase. A: MBTH (3-metil-2-benzotiazolona hidrazona); B: G3P (D-gliceraldeído-3-fosfato); C: Azida; D: corante tetrazopentametincianina; E: composto azul formazana.

O caudal de aspiração (Tabela 5.3, etapa 14) foi fixado em 1,5 ml min⁻¹ e o caudal de propulsão no sentido do detetor (Tabela 5.1, etapa 15) foi fixado em 3,0 ml min⁻¹ de forma a evitar a diluição do composto final sem prejuízo da sensibilidade.

A temperatura ótima referida para a aldolase é cerca de 20-25°C (28) e a reação oxidativa com o MBTH requiere uma temperatura de 30°C. Numa tentativa de realizar todo o procedimento à mesma temperatura, inicialmente a metodologia foi testada mantendo todas as soluções à temperatura ambiente (20-25°C). Nestas condições os sinais analíticos obtidos eram muito baixos provavelmente devido à baixa taxa de reação da reação oxidativa.

Em seguida, a câmara de mistura foi imersa num banho termostaticado a 30°C e finalmente, a enzima e as soluções de substrato foram mantidas à temperatura ambiente enquanto as soluções de MBTH e FeCl₃ a 30°C. Com estas condições os sinais analíticos obtidos eram muito superiores o que confirma que a temperatura ótima para a aldolase se situa entre 20-25°C enquanto a segunda fase requiere uma temperatura mais elevada.

Nas condições otimizadas, foi obtida uma resposta linear numa gama de concentrações entre 7-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com a seguinte curva de calibração $\text{Abs. (U.A.)} = 0,0144 (\pm 0,0049)C (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,0227 (\pm 0,0002)$, $R^2 = 0,9954$ (Figura 5.4). A repetibilidade do procedimento em fluxo foi obtida através do cálculo do desvio padrão relativo (R.S.D.) de 10 ciclos consecutivos com uma concentração fixa de LI. Foram obtidos valores entre 1,8 e 7% nos ensaios efetuados para todos os LI com concentrações entre 5 e 50%, mostrando pequenas diferenças numa gama significativa de concentrações.

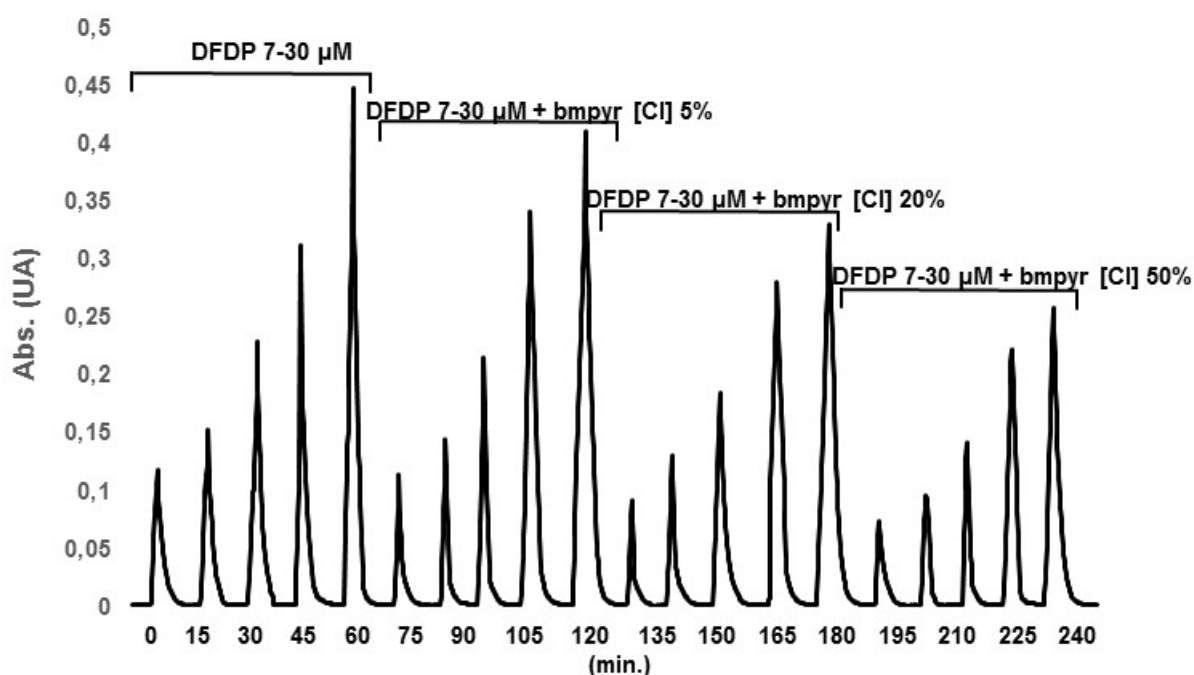


Figura 5.4 – Sinais analíticos obtidos durante a avaliação da atividade da aldolase (DFDP 7-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e inibição do bmpyr [CI] (5-50%).

5.1.3.2. Efeito dos LIs e solventes orgânicos na atividade da aldolase

Tal como foi referido anteriormente, neste trabalho a atividade da aldolase foi avaliada na presença de dois solventes orgânicos e vários LIs comerciais na perspetiva dos LIs serem um meio reacional alternativo nas reações de síntese que tenham como base esta enzima. Nestes ensaios, foram preparadas uma série de soluções de substrato com três diferentes concentrações de solventes orgânicos e LIs (5, 20 e 50%) e o efeito sobre a atividade da aldolase foi avaliada através da metodologia automática desenvolvida. Os resultados expressos em termos de percentagem de inibição, foram calculados a partir

da inibição causada por cada solvente em comparação com os resultados obtidos em meio estritamente aquoso. A percentagem de inibição foi calculada através do declive obtido das correlações lineares (Tabela 5.2) estabelecido com DFDP ($7\text{-}30\ \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão e na presença dos solventes orgânicos selecionados e dos LIs. Os resultados dos ensaios de inibição estão graficamente sumariados na Figura 5.5.

Tabela 5.2 – Declive das correlações lineares obtidas durante o estudo da atividade da aldolase em DMF, metanol e LIs (5,20 e 50%)

Meio reacional	Declive (\pm erro) *		
	(UA mmol L ⁻¹)		
	5%	20%	50%
Tampão	14,4 ($\pm 0,8$)		
Dimetilformamida	12,2 ($\pm 0,8$)	9,0 ($\pm 0,4$)	4,3 ($\pm 0,8$)
Metanol	13,0 ($\pm 0,7$)	11,2 ($\pm 0,6$)	8,1 ($\pm 0,4$)
bmpyr [Cl]	13,7 ($\pm 0,8$)	12,2 ($\pm 0,5$)	9,6 ($\pm 0,4$)
hmim [Cl]	13,7 ($\pm 0,8$)	12,2 ($\pm 0,8$)	9,6 ($\pm 0,7$)
bmim [BF ₄]	13,7 ($\pm 0,7$)	12,4 ($\pm 0,4$)	9,8 ($\pm 0,3$)
emim [BF ₄]	13,9 ($\pm 1,0$)	12,6 ($\pm 0,6$)	10,3 ($\pm 0,3$)
emim [Ac]	13,9 ($\pm 0,7$)	12,7 ($\pm 0,6$)	10,7 ($\pm 0,3$)
bmim [Cl]	14,0 ($\pm 0,8$)	13,1 ($\pm 0,8$)	11,7 ($\pm 0,7$)
emim [TfMs]	14,0 ($\pm 0,8$)	13,4 ($\pm 1,0$)	12,1 ($\pm 1,0$)
emim [Ms]	14,1 ($\pm 0,7$)	13,6 ($\pm 1,1$)	12,3 ($\pm 1,0$)
chol [Ac]	14,3 ($\pm 0,7$)	14,2 ($\pm 1,1$)	14,0 ($\pm 1,2$)

* média de três determinações.

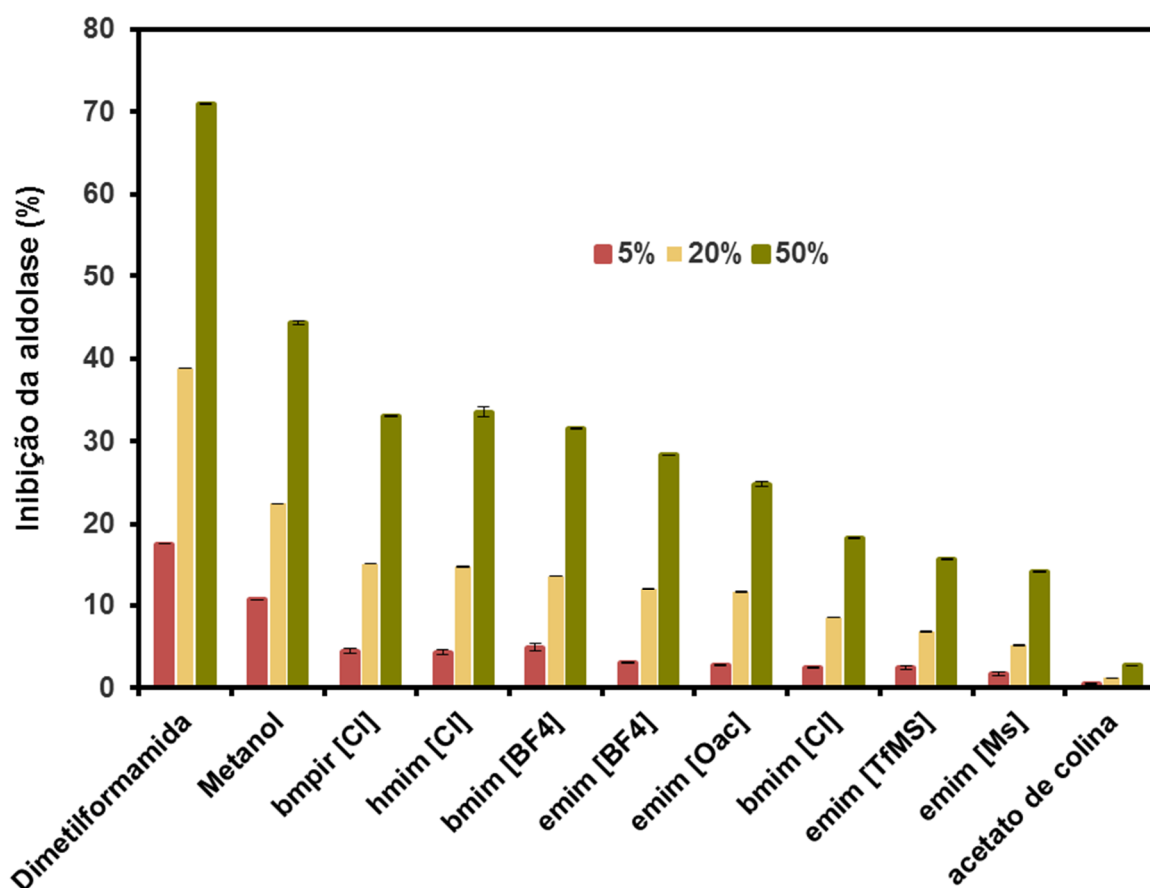


Figura 5.5 – Resultados da atividade da aldolase em solventes orgânicos e LI (expressos como percentagem de inibição).

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que todos os solventes testados causam inibição na enzima quando comparados com os ensaios em meio estritamente aquoso. Esta inibição foi dependente tanto da natureza como da concentração dos solventes. Quanto aos LIs, foi observado que todos os compostos provocaram uma menor inibição que a dimetilformamida ou o metanol, que são os solventes mais usuais em processos de síntese catalisados por esta enzima (21, 22). Estas diferenças podem ser superiores a 65% desde que o solvente mais tóxico (dimetilformamida) e o LI (chol [Ac]) estejam a ser comparados. As vantagens previamente mencionadas da biocatálise em LIs, nomeadamente as suas capacidades de formação de ligações de hidrogénio, podem ser responsáveis pelo decréscimo da inibição devido a um aumento a estabilidade proteica. Entre os LIs foram observadas diferenças significativas com variações na ordem dos 30% em termos de inibição enzimática, nomeadamente entre o bmpyr [Cl] e chol [Ac], os compostos mais e menos tóxicos, respetivamente. Estas diferenças estão relacionadas

com a variabilidade da estrutura dos LIs testados que apresentam diferenças a nível do grupo catiónico, comprimento de cadeias lateral carbonada e do anião.

Em relação aos grupos catiónicos, foi observado que os LIs que contêm o grupo pirrolidínio provocam uma inibição semelhante relativamente aos que apresentam o grupo hexilimidazólio e moderadamente mais elevada em relação aos que apresentam o grupo butilimidazólio, na presença do mesmo anião [Cl], sendo a percentagem de inibição de 33,1% contra 18,2%.

Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura em que referem que o catião pirrolidínio é mais agressivo que o imidazólio tanto em enzimas como organismos (31). Ainda em relação ao grupo catiónico, os resultados obtidos confirmam que a colina é um dos grupos mais promissores pois causa uma inibição mínima (2,7%) na atividade da aldolase, mesmo quando está presente numa concentração de 50%. A comparação da inibição causada pela chol [Ac] e emim [Ac] reforça mais esta suposição pois ambos os LIs apresentam o mesmo anião e assim as diferenças observadas são devidas à natureza do catião. Tendo em consideração que a colina é um nutriente que surge naturalmente é esperado que o LI que incorpore este catião tenha um impacto muito baixo nos elementos biológicos, desde que a natureza do anião também seja favorável. Estas afirmações foram bem discutidas e confirmadas em trabalhos recentes que fazem referência à toxicidade de LIs derivados da colina (32-34). O efeito do aumento do comprimento das cadeias no grupo dos imidazólio foi estudado através da comparação dos resultados obtidos entre o hmim [Cl] e bmim [Cl] (Figura 5.6) e entre o bmim [BF₄] e emim [BF₄]. Foi observado que a inibição enzimática aumenta com o aumento da cadeia alquílica, o que está de acordo com o descrito em trabalhos prévios relacionados com diferentes organismos (31, 35, 36). A este nível os resultados podem ser discutidos tendo em consideração o aumento da lipofilicidade associada com o aumento da cadeia alquílica. Os compostos mais lipofílicos podem interagir mais rapidamente com a bolsa hidrofóbica existente na superfície da aldolase, formada por carbonos alifáticos das cadeias laterais dos resíduos básicos presentes no sítio ativo da enzima, e competir com o substrato, reduzindo desta forma a atividade da aldolase.

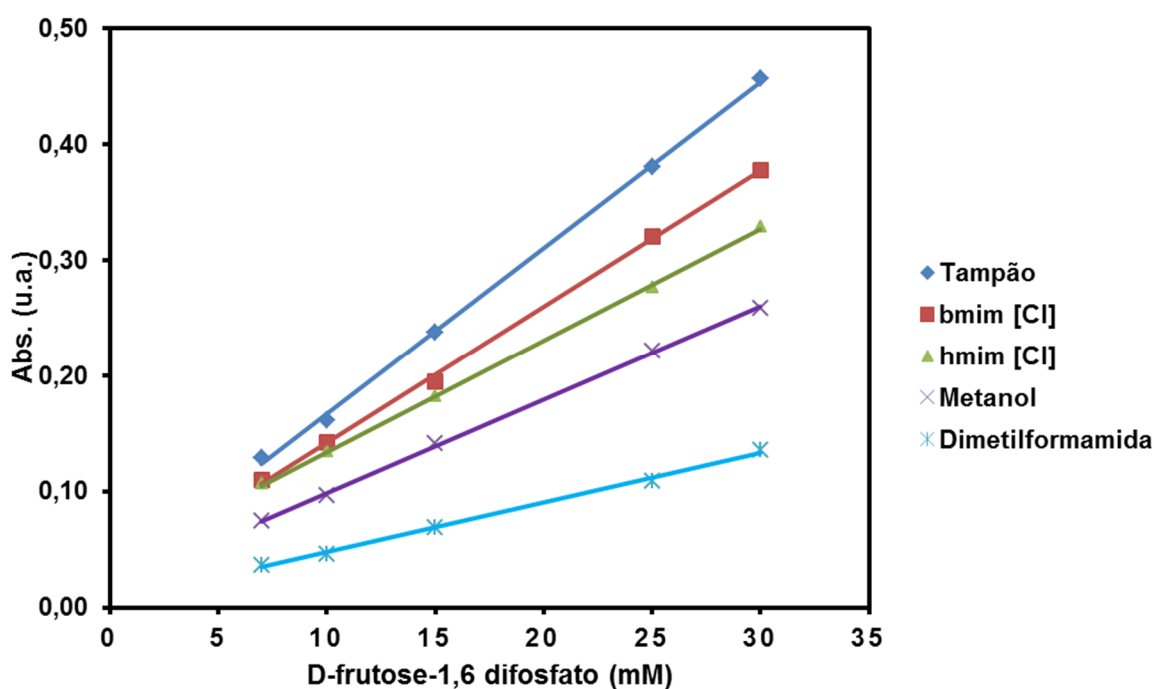


Figura 5.6 – Atividade da aldolase na presença de bmim [Cl], hmim [Cl] e solventes orgânicos.

A influência de diferentes grupos aniônicos incorporados nos LIs sobre diversos organismos biológicos tem sido amplamente discutida e têm sido obtidos resultados heterogêneos (37-39). Neste estudo a avaliação do impacto do anião na atividade da aldolase foi feita recorrendo a cinco aniões normalmente utilizados: cloreto ([Cl]), tetrafluoroborato ([BF₄]), trifluorometano ([TfMs]), metanosulfonato ([Ms]) e acetato ([Ac]). O estudo incluía aniões inertes e biocompatíveis tais como o cloreto e o acetato e outros com efeito esperado na atividade enzimática como o BF₄. Os resultados da atividade da aldolase com LIs com emim (Figura 5.7) evidenciam que o inibidor mais potente é o anião BF₄, o que está em concordância com vários estudos que associam este anião com a formação de ácido hidrofúorídrico (24, 40, 41). Isto é também confirmado através da comparação dos resultados obtidos com bmim [BF₄] e bmim [Cl] que causaram inibições de 31,4 e 18,2%, respectivamente com uma concentração de 50%.

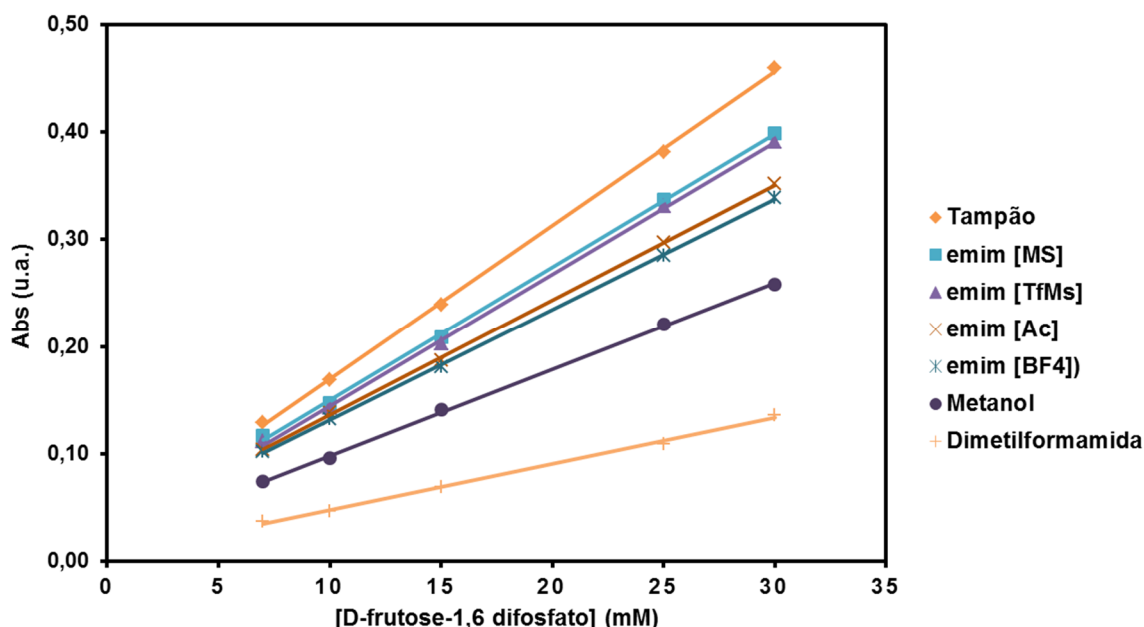


Figura 5.7 – Actividade da aldolase na presença de emim [Ms], emim [TfMS], emim [Ac], emim [BF₄] e solventes orgânicos.

Observando ainda os resultados dos LIs com emim conclui-se que os LIs com acetato causaram neste estudo, uma forte inibição enzimática em relação aos LIs que contêm Ms ou TfMs. Apesar desse resultado ser inesperado, devido à maior biocompatibilidade natural do acetato, existe um estudo recente com comportamento semelhante do anião acetato em rebentos de cevada (39). Isto indica que a previsão da influência dos LIs não é linear e pode ser afetada por outros fatores, além da variabilidade estrutural, tais como a formação de pares iónicos ou a formação de agregados, pois determinam a forma como os iões se apresentam em solução podendo dar origem a feitos de sinergismo ou antagonismo.

Por comparação do comportamento da aldolase na presença de emim [TfMs] e emim [Ms] verifica-se que estes aniões não afetam significativamente a atividade da aldolase e desta forma a toxicidade destes LIs deverá estar relacionada essencialmente com os seus grupos catiónicos e tamanho da cadeia lateral, dado que o valor da inibição da aldolase é muito semelhante (15,7 e 14,1 %, respetivamente com uma concentração de 50%).

5.1.4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que a implementação de sínteses catalisadas pela aldolase em meio constituído por LIs pode apresentar diversas vantagens em relação ao uso de solventes convencionais, não apenas em termos de segurança, mas também em termos de rendimento da síntese, dado que a atividade da enzima é de um modo geral mais elevada com LIs. Os LIs derivados da colina e os imidazólios com cadeias laterais mais curtas quando associados a aniões biocompatíveis são os compostos mais promissores para o desenvolvimento de reações de síntese com a aldolase. No entanto, tendo em consideração que a lipofilicidade dos LIs e as suas propriedades de partilha dependem da concentração, devido ao emparelhamento dos iões (46), a concentração dos LIs selecionados pode ser ajustada às necessidades particulares de cada processo de síntese no sentido de ser obtido um menor impacto na atividade enzimática relativamente aos solventes orgânicos, que geralmente são compostos hidrofílicos.

5.1.5.Referências bibliográficas

1. Grodowska K, Parczewski A. Organic Solvents in the Pharmaceutical Industry. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2010;67(1):3-12.
2. Anastas P, Eghbali N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem Soc Rev.* 2010;39:301-12.
3. Alfonsi K, Colberg J, Dunn PJ, T. Fevig, Jennings S, Johnson TA, et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chem.* 2008;10:31-6.
4. Sheldon RA, Arends I, Hanefeld U. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany; 2007.
5. Sheldon RA. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chem.* 2005;7:267-78.
6. Welton T. Room-Temperature Ionic Liquids. *Solvents for Synthesis and Catalysis.* *Chem Rev.* 1999;99:2071-83.
7. Hallett JP, Welton T. Room-Temperature Ionic Liquids: Solvents for Synthesis and Catalysis. 2. *Chem Rev.* 2011;111(5):3508-76.
8. P. Wasserscheid TW. Ionic liquids in synthesis. ed n, editor: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2008.
9. Sowmiah S, Cheng CI, Chu YH. Ionic Liquids for Green Organic Synthesis. *Curr Org Synth.* 2012;9(1):74-95.
10. Rantwijk Fv, Sheldon RA. Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical reviews.* 2007;107(6):2757-85.
11. Pinto P, Saraiva M, Lima J. Oxidoreductase Behavior in Ionic Liquids: a Review. *Anal Sci.* 2008;24(10):1231-8.
12. Yang Z, Pan WB. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microb Tech.* 2005;37(1):19-28.
13. Greaves TL, Drummond CJ. Protic Ionic Liquids: Properties and Applications. *Chemical reviews.* 2008;108:206-37.
14. Fecher E, Major B, Belafi-Bako K, Gubicza L. On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(6):1624-7.
15. Kaftzik N, Wasserscheid P, Kragl U. Use of Ionic Liquids to Increase the Yield and Enzyme Stability in the β -Galactosidase Catalysed Synthesis of N-Acetyllactosamine. *Org Process Res Dev.* 2002;6(4):553-7.

16. Concia AL, Lozano C, Castillo JA, Parella T, Joglar J, Clapes P. D-Fructose-6-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Cascade Chemical-Enzymatic Preparation of Sugar-Related Polyhydroxylated Compounds. *Chem Eur J*. 2009;15(15):3808-16.
17. Dean SM, Greenberg WA, Wong C-H. Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis. *Adv Synth Catal*. 2007;349(8-9):1308-20.
18. Meyer H-P, Eichhorn E, Hanlon S, Luetz S, Schuermann M, Wohlgemuth R, et al. The use of enzymes in organic synthesis and the life sciences: perspectives from the Swiss Industrial Biocatalysis Consortium (SIBC). *Catal Sci Technol*. 2013;3:29-40.
19. M. Sugiyama, Greenberg W, Wong C-H. Recent advances in aldolase-catalyzed synthesis of unnatural sugars and iminocyclitols. *J Synth Org Chem Jpn*. 2008;66:605-15.
20. Schurmann M, Schurmann M, Sprenger GA. Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli* as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxysugars. *J Mol Catal B: Enzym*. 2002;19-20:247-52.
21. Hao JJ, Berry A. A thermostable variant of fructose bisphosphate aldolase constructed by directed evolution also shows increased stability in organic solvents. *Protein Eng, Des Selec*. 2004;17(9):689-97.
22. Budde CL, Khmelnitsky YL. Aldolase stability in the presence of organic solvents. *Biotechnol Lett*. 1999;21(1):77-80.
23. Silvestre CIC, Pinto PCAG, Segundo MA, Saraiva MLMFS, Lima JLFC. Enzyme based assays in a sequential injection format: A review. *Anal Chim Acta*. 2011;689(2):160-77.
24. Pinto PCAG, Costa ADF, Lima JLFC, Saraiva MLMFS. Automated evaluation of the effect of ionic liquids on catalase activity. *Chemosphere*. 2011;82(11):1620-8.
25. Pinto PCAG, Costa SPF, Lima JLFC, Saraiva MLMFS. β -Galactosidase activity in mixed micelles of imidazolium ionic liquids and sodium dodecylsulfate: A sequential injection kinetic study. *Talanta*. 2012;96:26-33.
26. Sibirny VA, Gonchar MV, Grabek-Lejko D, Pavlishko HM, Csoregi E, Sibirny AA. Photometric assay of methanol and formaldehyde in industrial waste-waters using alcohol oxidase and 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Int J Environ an Ch*. 2008;88(4):289-301.
27. Vieira JA, Raimundo IM, Jr., Reis BF, Zagatto EAG, Lima JLFC. Sampling strategies in sequential injection analysis: Exploiting the monosegmented-flow approach. *Anal Chim Acta*. 1998;366(1-3):257-62.
28. Blostein R, W.J.Rutter. Comparative Studies of Liver and Muscle Aldolase: II. IMMUNOCHEMICAL AND CHROMATOGRAPHIC DIFFERENTIATION *JBiolChem*. 1963;238:3280-5.

29. Lewis DJ, Lowe G. Inhibition of Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase from Rabbit Muscle and *Bacillus stearothermophilus*. *Eur J Biochem*. 1977;80(1):119-33.
30. Oliveira FSd, Leite BCO, Andrade Md, Korn M. Determination of total aldehydes in fuel ethanol by MBTH method - sequential injection analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2005;16(1):87-92.
31. Jastorff B, K.Molter, P.Behrend, U.Bottin-Weber, J.Filser, A.Heimers, et al. Progress in evaluation of risk potential of ionic liquids—basis for an eco-design of sustainable products. *Green Chem*. 2005;7:362-72.
32. Weaver KD, Kim HJ, Sun JZ, MacFarlane DR, Elliott GD. Cyto-toxicity and biocompatibility of a family of choline phosphate ionic liquids designed for pharmaceutical applications. *Green Chem*. 2010;12:507-13.
33. P.Nockemann, B.Thijs KD, C.R.Janssen, K.VanHecke, L.VanMeervelt, Kossmann S, et al. Choline Saccharinate and Choline Acesulfamate: Ionic Liquids with Low Toxicities. *JPhysChemB*. 2007;111(19):5254-63.
34. S.P.M.Ventura, F.A.E.Silva, A.M.M.Goncalves, J.L.Pereira, F.Goncalves, J.A.P.Coutinho. Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014;102:48-54.
35. Ranke J, K.Molter, F.Stock, U.Bottin-Weber, J.Poczobutt, J.Hoffmann, et al. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2004;58(3):396-404.
36. McLaughlin M, Earle MJ, Gilea MA, Gilmore BF, Gorman SP, Seddon KR. Cytotoxicity of 1-alkylquinolinium bromide ionic liquids in murine fibroblast NIH 3T3 cells. *Green Chem*. 2011;13:2794-800.
37. Arning J, Stolte S, Boschen A, Stock F, Pitner WR, Welz-Biermann U, et al. Qualitative and quantitative structure activity relationships for the inhibitory effects of cationic head groups, functionalised side chains and anions of ionic liquids on acetylcholinesterase. *Green Chem*. 2008;10:47-58.
38. Matzke M, S.Stolte, K.Thiele, T.Juffernholz, J.Arning, J.Ranke, et al. The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. *Green Chem*. 2007;9:1198-207.
39. Bubalo MC, K.Hanousek, K.Radosevic, V.G.Srcek, T.Jakovljevic, Redovnikovic IR. Imidiazolium based ionic liquids: Effects of different anions and alkyl chains lengths on the barley seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014;101:116-23.
40. P.C.A.G.Pinto, S.P.F.Costa, J.L.F.C.Lima, M.L.M.F.S.Saraiva. Automated high-throughput *Vibrio fischeri* assay for (eco)toxicity screening: Application to ionic liquids. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;80:97-102.

41. Freire MG, Neves C, Marrucho IM, Coutinho JAP, Fernandes AM. Hydrolysis of Tetrafluoroborate and Hexafluorophosphate Counter Ions in Imidazolium-Based Ionic Liquids. *J Phys Chem A*. 2010;114(11):3744-9.

CAPÍTULO 6

Avaliação da toxicidade de líquidos iônicos através de um ensaio automatizado de inibição da atividade da glutathiona redutase

6.1. Avaliação da toxicidade de líquidos iônicos através de um ensaio automatizado de inibição da atividade da glutathione redutase

6.1.1. Introdução

O crescente aumento de aplicações dos LIs torna urgente o conhecimento da toxicidade destes compostos para prever o seu impacto no ambiente e na saúde humana. Esta avaliação deverá ser parte integrante do desenvolvimento sustentável dos compostos químicos, através de um trabalho multidisciplinar entre diferentes classes de investigadores, relacionando a estrutura-atividade com dados de testes (eco)toxicológicos.

A nível subcelular, vários ensaios de inibição enzimática fornecem informações muito úteis sobre a toxicidade de LIs (1-5). De facto, enquanto testes com maior nível de complexidade permitem uma melhor compreensão do meio ambiente. Testes moleculares e celulares são úteis para clarificar o impacto de elementos estruturais em particular e conduzem a uma modificação no sentido da redução do potencial efeito nefasto. A avaliação da toxicidade através da inibição enzimática apresenta como vantagens a simplicidade de implementação laboratorial e interpretação de resultados assim como uma redução de custos e duração dos ensaios. Existem já autores que confirmaram o paralelismo entre os resultados de avaliação da toxicidade entre enzimas e plantas (6). Além deste tópico, está bem documentada a importância de avaliar a influência de xenobióticos nas enzimas do sistema antioxidante de organismos aquáticos e terrestres para monitorizar tanto a qualidade ambiental como a aptidão dos organismos que habitam ecossistemas. Entre essas enzimas, a glutathione redutase (GR) é um importante biomarcador pois tem um papel fundamental no metabolismo e desintoxicação de xenobióticos, inativando radicais hidroxilo assim como vários compostos eletrofílicos. A GR é uma enzima fundamental pois reduz a glutathione dissulfido (GSSG) à sua forma sulfídrica GSH (glutathione reduzida) através de um mecanismo dependente do NADP, um importante sistema antioxidante celular. Alterações no metabolismo da glutathione em associação com um aumento do stress oxidativo tem sido relacionado com a patogenicidade de diversas doenças.

A glutathione tem sido utilizada para avaliar o efeito tóxico de diferentes grupos de compostos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (7), cianotoxinas (8), farmacêuticos (9) assim como LIs (3, 10). Paskova e colaboradores (7) estudaram o efeito de três hidrocarbonetos aromáticos heterocíclicos (PAHs - fenantreno, antraceno e fluoreno) e os seus sete derivados N-heterocíclicos em plantas terrestres *Sinapis alba*, *Triticum aestivum* e *Phaseolus vulgaris* e o seu efeito relacionado com o stress oxidativo foi determinado com biomarcadores, como a GR. Outros estudos com animais foram

usados para avaliar os efeitos da exposição a cianotoxinas (8) Os resultados indicam que o sistema antioxidante exerce um papel protetor dos tecidos aos múltiplos agressores. T. Roušar e colaboradores (9) investigaram um novo mecanismo de toxicidade do acetaminofeno, especialmente para explorar a possibilidade de inibição da GR, através da conjugação do acetaminofeno-glutationa. M. Yu (3) e colaboradores, M. Kumar e colaboradores (10), estudaram a toxicidade e os efeitos biológicos de alguns LIs sobre o sistema antioxidante enzimático do fígado de rato e na *Green Seaweed Ulva lactuca*, respetivamente, e a GR foi escolhida como biomarcador para determinar o *stress* oxidativo causado pelos LIs.

Todos estes ensaios devem, foram incluídos em estudos mais globais sobre o efeito dos xenobióticos no sistema de defesa antioxidante de diversas entidades biológicas.

Este trabalho teve como objetivo, recorrendo ao nível subcelular, avaliar diretamente os efeitos de inibição de vários LIs na atividade da GR, com o objetivo de contribuir para a previsão da toxicidade a nível humano.

Neste trabalho propõe-se o desenvolvimento de um sistema SIA, recorrendo a um procedimento de imobilização da enzima e a uma diluição em linha dos inibidores.

A metodologia selecionada teve como base a transformação da glutathiona dissulfeto (GSSG) na sua forma sulfídrica (GSH) através da reação catalisada pela enzima GR, na presença de NADPH. A glutathiona reduzida reagia com o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB dando origem ao ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico (TNB) de cor amarela (412 nm) (Figura 6.1).

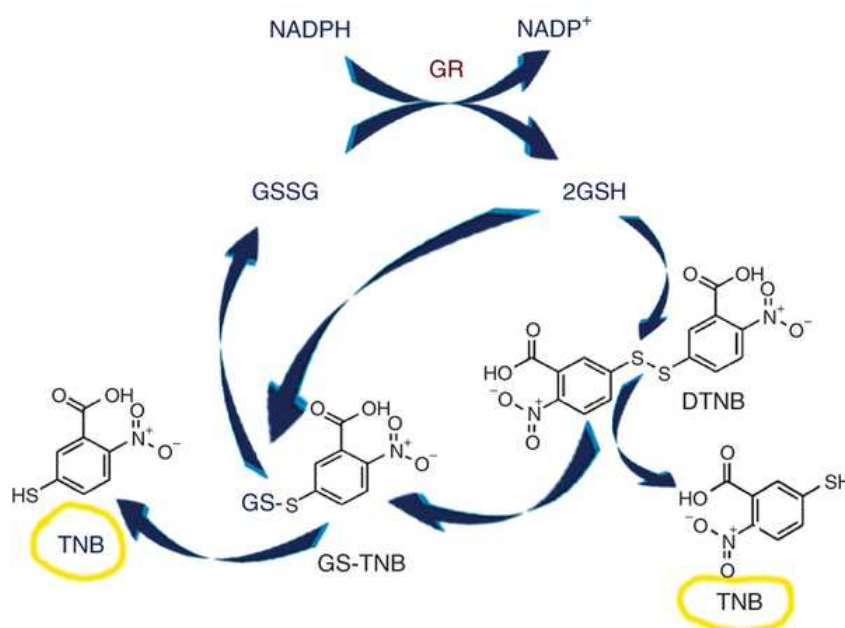


Figura 6.1 – Ensaio de regeneração DTNB-glutathiona reductase.

Este trabalho teve como base um método usado para a determinação de glutathiona oxidada e reduzida em amostras de sangue (11). Foram necessárias várias alterações ao sistema no sentido de ter uma ferramenta versátil, de baixo custo e robusta para avaliar a inibição enzimática com os LIs. Para que essas alterações fossem vantajosas foi necessário otimizar novamente o sistema SIA antes deste ser usados na avaliação dos LIs.

A atividade da GR foi estudada em meio aquoso e em soluções aquosas com quantidades crescentes de tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [BF₄]); cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [Cl]); metanosulfonato de tetrabutilfosfônio (tbph [MS]); cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio (bmpyr [Cl]); tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [BF₄]); trifluorometanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [TfMs]); metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ms]) foram preparadas diariamente. (Figura 6.2), com o objetivo de prever a toxicidade humana dos compostos testados.

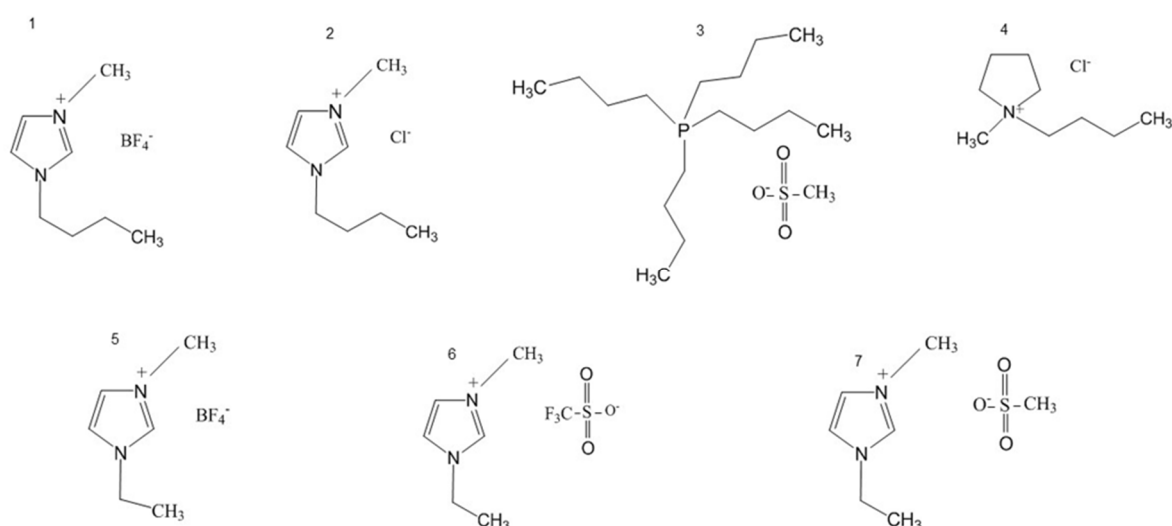


Figura 6.2 – Estrutura química dos compostos estudados. 1: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [BF₄]); 2: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (bmim [Cl]); 3: metanosulfonato de tetrabutilfosfônio (tbph [MS]); 4: cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio (bmpyr [Cl]); 5: tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [BF₄]); 6: trifluorometanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [TfMs]); 7: metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio (emim [Ms]).

6.1.2. Materiais e métodos

6.1.2.1. Reagentes e soluções

A solução transportadora empregue no sistema SIA, desenvolvido para a avaliação da toxicidade dos LIs através da inibição da glutathione redutase, foi uma solução tampão obtida por dissolução do diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (Riedel-de Haën) numa concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Fluka) 1 mmol L^{-1} . O pH desta solução foi ajustado a 7,0 unidades com uma solução de hidróxido de potássio (Merck) 2 mol L^{-1} .

As soluções de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DNTB (Fluka) e $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de sal tetrassódico de β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida (NADPH, Sigma-Aldrich) foram preparadas diariamente na solução tampão.

A solução padrão concentrada de 2 mmol L^{-1} de GSSG (Fluka) foi preaparada diariamente por dissolução de uma quantidade apropriada de glutathione na solução tampão. As soluções de trabalho foram preparadas a partir desta solução por diluição adequada em tampão.

Todas as soluções eram protegidas da luz durante o seu uso.

Para os ensaios de inibição as soluções aquosas de (bmim $[\text{BF}_4]$), (bmim $[\text{Cl}]$), (emim $[\text{BF}_4]$), (emim $[\text{TfMs}]$), (emim $[\text{Ms}]$), (tbph $[\text{Ms}]$), (bmpyr $[\text{Cl}]$), foram preparadas diariamente.

Os LIs foram adquiridos na Sigma-Aldrich e mantidos em ambiente anidro.

6.1.2.2. Reagentes usados no processo de imobilização

A solução de GR (EC 1.6.4.2, da levedura do pão da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, em suspensão de sulfato de amónio (Sigma-Aldrich), apresentava uma atividade específica de 160 U mg^{-1} de proteína.

As esferas de vidro alquilaminado (AGB, do Inglês “aminopropyl glass beads”) usadas no processo de imobilização foram da marca Sigma e apresentavam granulometrias de 80-120 e 200-400 mesh e um diâmetro médio de poro de 700 \AA .

A solução de glutaraldeído a 2,5% foi obtida por diluição da solução de glutaraldeído a 25% (Sigma-Aldrich) com a solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

6.1.2.3. Procedimento de imobilização

O procedimento utilizado envolveu numa primeira fase a ativação das esferas e numa segunda fase a imobilização propriamente dita (12).

Para a ativação das esferas foram adicionadas 0,125 g de esferas de vidro alquilaminado a 2,5 ml de uma solução de glutaraldeído a 2,5%. Este conjunto foi colocado numa placa de agitação durante uma hora à temperatura ambiente. Durante a primeira hora, de 10 em 10 minutos, fazia-se borbulhar azoto para remover o oxigénio. Finalmente as esferas foram lavadas com água desionizada e solução tampão fosfato a 0,1 mol L⁻¹ com pH 7,5.

Para a imobilização da enzima na superfície das esferas, anteriormente ativadas, foram adicionados 10 U ml⁻¹ da enzima GR. O goblé foi colocado em gelo durante cerca de 4 horas. Durante a primeira meia hora, e de 10 em 10 minutos, fazia-se igualmente borbulhar azoto. Terminada esta fase realizava-se uma filtração em funil de Buckner e as esferas com a enzima imobilizada eram lavadas sucessivamente com água e solução tampão de Tris-HCl/CaCl₂ (50/20 mM) com pH 8,0 para eliminar a enzima não imobilizada.

O reator enzimático foi obtido por empacotamento da GR imobilizada numa coluna de polimetilmetaacrilato (PMMA), em cujas extremidades se colocaram 2 discos de filtro com diâmetro de poro de 35 µm (Mobi Tec M2235), de modo a reter as esferas no seu interior. O reator com as esferas, quando não estava a ser utilizado, era armazenado com solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 7,4 a 4°C.

6.1.2.4. Aparelhagem

Os componentes constantes da montagem SIA (Figura 6.3), designadamente, bomba peristáltica, válvulas, detetor e registador, foram previamente descritos no Capítulo 2.

O tubo de armazenamento (TA) apresentava um comprimento de 200 cm, com configuração em figuras de oito. O tubo de diluição (TD) apresentava um comprimento de 200 cm.

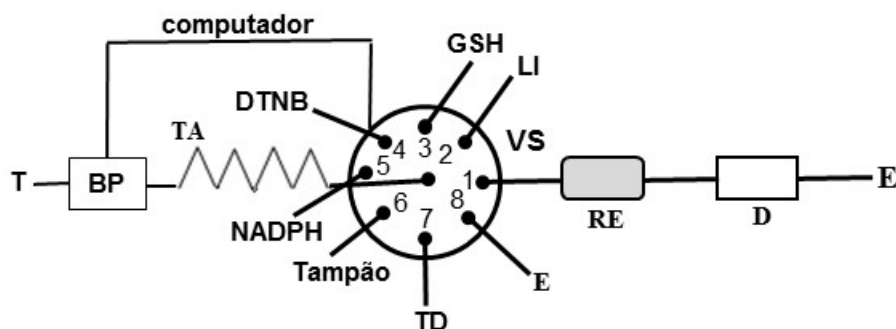


Figura 6.3 – Sistema SIA usado na determinação da atividade da glutatona. T, transportador; BP, bomba peristáltica; VS, válvula seletora de fluídos; TD, tubo de diluição, TA, tubo de armazenamento (2m); RE, reator enzimático; D, detetor, E, esgoto.

6.1.2.5. Procedimento experimental

O ciclo analítico proposto para a avaliação da atividade da GR (Tabela 6.1) foi iniciado com a aspiração de 50 μ L de LI, para o tubo de armazenamento (etapa 1). O fluxo era invertido e o LI enviado para o tubo de diluição (etapa 2). O conteúdo do tubo de armazenamento era direcionado para o esgoto ficando este, preenchido apenas com solução transportadora (etapa 3). De seguida, 100 μ L de GSSG, 12,5 μ L de LI diluído (a partir do TD), 50 μ L de DTNB e 50 μ L de NADPH eram aspiradas sequencialmente para o TA (etapas 4 a 7). A zona de reação era propulsionada para o reator enzimático, onde permanecia durante 120 s (etapas 8 e 9). Finalmente, a zona de reação era enviada para o detetor e o sinal proporcional à atividade enzimática era monitorizado (etapa 10). O ciclo (etapas 4-11) era repetido as vezes necessárias para construir o perfil completo de inibição para cada composto. No final, o tubo de diluição era lavado com o transportador para eliminar o LI remanescente (etapa 11).

Tabela 6.1 – Protocolo analítico para a determinação da atividade da glutatona

Etapa	Posição da válvula	Tempo de operação (s)	Caudal (ml min^{-1})	Volume (μL)	Descrição
1	2	3,75	0,8	50	Aspiração do volume V_s de LI para o TA
2	7	26	0,8	350	Propulsão do LI (V_T) do TA para o TD
3	8	50	1,5	---	Lavagem do TA
4	3	7,5	0,8	100	Aspiração da L-glutaciona oxidada
5	7	2,5	0,3	12.5	Transferência do volume de LI V_A do TD para TA
6	4	3,75	0,8	50	Aspiração do DTNB
7	5	3,75	0,8	50	Aspiração do NADPH
8	1	22	1,0	---	Propulsão da sequência para o reator
9	1	120	0	---	Período de paragem
10	1	75	1.5	---	Propulsão até ao reator e aquisição do sinal
11	7	75	1.5	---	Lavagem do TD

6.1.3.Resultados e discussão

6.1.3.1. Otimização da determinação da GR no sistema de fluxo

Os primeiros ensaios de otimização foram efetuados em meio aquoso e tiveram como objetivo a recolha de dados para analisar as melhores condições do ensaio de avaliação da atividade da GR (Tabela 6.2, Figuras 6.4 e 6.5). Estes ensaios foram efetuados com padrões de GSSG com concentrações que variaram entre 0,3 e 1,5 μM .

Tabela 6.2 – Intervalo dos valores estudados nos ensaios de otimização e valores selecionados para os ensaios finais.

Parâmetro	Intervalo	Valor selecionado
GSSG volume (µL)	50 – 250	100
NADPH concentração (mM)	0,2 – 1,4	1,2
DTNB concentração (mM)	1 – 4	3
NADPH volume (µL)	25 – 75	50
DTNB volume (µL)	25 – 75	50

O estudo do efeito do volume de GSSG entre 50 e 250 µL mostrou que 100 µL aumentou a sensibilidade em 49% relativamente ao volume de 50 µL (Figura 6.4). Para volumes superiores o aumento da sensibilidade não era significativo. Desta forma, foi escolhido o volume de 100 µL para o ensaio.

Sendo o aumento do volume de amostra um forma efetiva de aumentar a sensibilidade, foram estudados volumes entre 25 e 75 µL para o NADPH e DTNB, havendo apenas um aumento de sensibilidade de 6% para volumes até 75 µL. Assim, foi escolhido o volume de 25 µL de ambos os reagentes para os ensaios seguintes.

Para avaliar o efeito da concentração de NADPH foram efetuados estudos entre 0,2 e 1,4 mM (Figura 6.5). Os resultados evidenciaram um aumento da atividade da enzima em cerca de 35% para a concentração de 1,2 mM. As diferenças obtidas com concentrações superiores (apenas de 1,5% entre 1,2 e 1,4 mM) não justificavam a sua utilização. Assim, a concentração de 1,2 mM de NADPH foi selecionada para os ensaios posteriores.

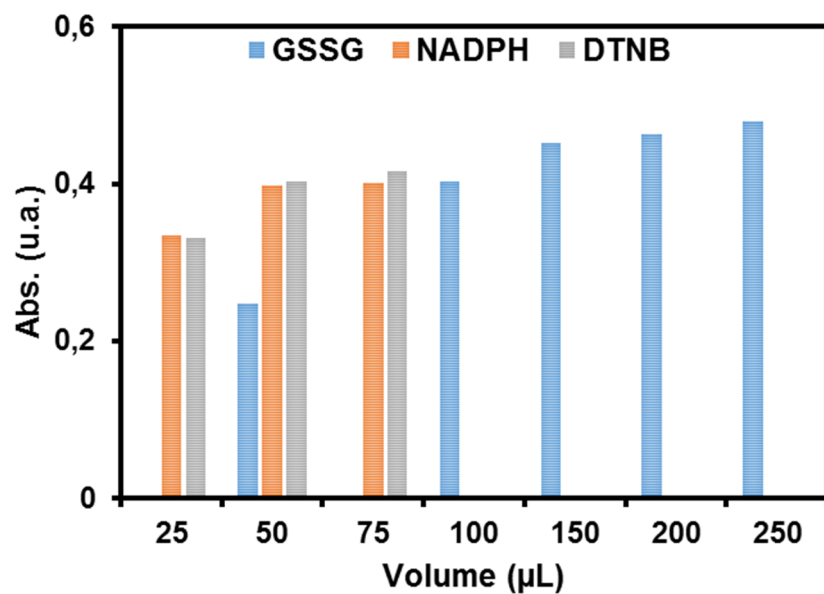


Figura 6.4 – Efeito dos diferentes volumes de GSSG, NADPH e DTNB no sinal obtido: (soluções de GSSG 0,8 µM).

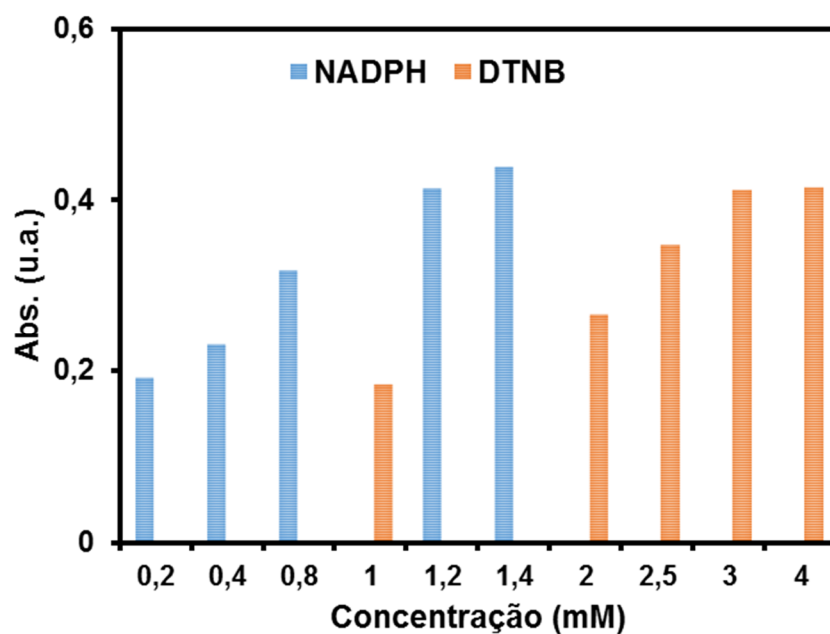


Figura 6.5 – Efeito de diferentes concentrações de NADH e DTNB no sinal obtido (solução padrão de GSSG 0,8 µM).

Seguidamente foram efetuadas curvas de calibração para diferentes concentrações de DTNB (1 – 4 mM) e verificou-se um aumento da produção de TNB de cerca 22% usando uma concentração de 3 mM. Para usufruir de um novo aumento da concentração de DTNB, seria necessário aumentar em simultâneo as concentrações dos outros reagentes envolvidos na reação de amplificação. Desta forma, foi escolhida uma concentração de DTNB igual a 3 mM.

A ordem de aspiração dos reagentes constitui um fator importante que exerce influência sobre a amplitude do sinal analítico e dispersão (13). A ordem pela qual as três soluções envolvidas na reação eram aspiradas pela seguinte ordem: GSSG, DTNB e NADPH. Assim, obtinha-se uma sobreposição completa das três zonas aquando da passagem no detetor, a aspiração da GSSG e DTNB antes do NADPH minimizava a dispersão do NADPH, um cofator essencial para a reação enzimática. No caso do DTNB, observa-se uma diminuição do sinal analítico de cerca 18% se esse fosse o primeiro reagente a ser aspirado.

No sentido de aumentar o tempo de reação e consequentemente a sensibilidade das determinações, foi implementado um período de paragem. Assim, após a aspiração dos reagentes para o TA, a zona de reação era enviada para o reator e um período de paragem era introduzido no ciclo analítico de modo a aumentar o tempo de contacto entre a enzima imobilizada, o substrato e o cofator. Foi analisado o efeito de paragem entre 30 e 180 s e a sensibilidade aumentou cerca de 3 vezes até um período de 120 s. Períodos mais longos não levavam a alterações significativas dos sinais analíticos e nesse sentido, foi implementado um período de paragem de 120 s, como compromisso entre o ritmo de amostragem e a sensibilidade.

6.1.3.2. Diluição em linha dos LIs

Tendo em consideração que a metodologia desenvolvida teve como objetivo a avaliação da toxicidade dos LIs, através da elaboração de curvas de inibição e do cálculo dos valores de EC_{50} , foi adotada uma estratégia de diluição em linha, o que aumentou a robustez do método desenvolvido. Esta estratégia recorreu ao uso de um tubo de diluição auxiliar (TD) no sentido de criar um gradiente de concentrações de LI e permitindo a aspiração de sequências de alíquotas com concentrações variáveis de LI, a partir de uma alíquota com concentração conhecida, diluída por dispersão no interior do sistema. A implementação da diluição em linha envolveu ensaios iniciais para calibrar o TD e para obter o perfil das diluições obtidas, tendo sido efetuado com uma solução corada de azul

de bromotimol. Geralmente, esta estratégia envolve três etapas para obter a diluição pretendida das alíquotas aspiradas. O volume da amostra ou reagente (V_s) a ser diluído era aspirado do tubo de armazenamento; em seguida, uma porção desta zona com um determinado volume - V_T (volume de transferência) era transferida do tubo de armazenamento para o tubo de diluição; finalmente uma porção da solução transferida, com um volume definido (V_A - volume de análise), era aspirado a partir de tubo de diluição para o tubo de armazenamento sendo utilizado para a análise. Eram seguidamente aspiradas alíquotas sequenciais para o tubo de diluição para serem posteriormente utilizadas nos ensaios.

Neste trabalho, o volume V_s foi fixado em 50 μL e os restantes parâmetros foram otimizados de acordo com o perfil de diluição pretendido. O V_T foi estudado para valores compreendidos entre 300 e 350 μL e conjugado com valores de V_A de 12,5 e 25 μL . Tendo em consideração a futura aplicação do método no sentido de avaliar a toxicidade dos LIs, os valores combinados de 350 μL de V_T e 25 μL de V_A deram origem a um perfil de diluição indicado para os objetivos propostos.

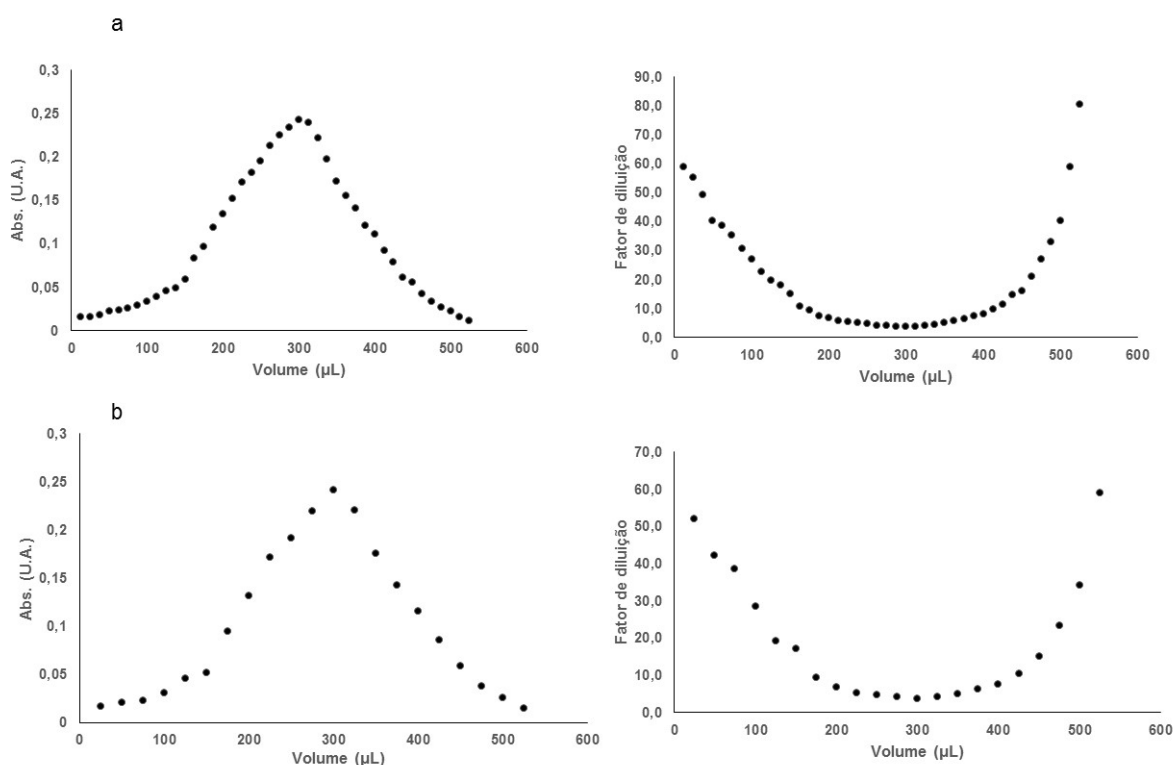


Figura 6.6 – Sinais analíticos e respetivos fatores de diluição, obtidos pela transferência, em ciclos analíticos consecutivos de volumes de análise (V_A) de 12,5 μL (a) ou 25 μL (b) para o tubo de armazenamento. Fator de diluição: nível de diluição obtido através do cálculo entre a razão dos sinais obtidos com e sem diluição.

A aspiração sequencial de alíquotas de 25 μL após a transferência de um volume de 350 μL para o tubo de diluição deu origem a valores de diluição compreendidos entre 3,7 e 58,9, tal como o representado na Figura 6.6 b. Por outro lado, a aspiração a alíquotas diluídas de 12,5 μL conduziram a um perfil de diluições mais amplo, com fatores de diluição compreendidos entre 3,6 e 80,4 vezes (Figura 6.6 a).

6.1.3.3. Aplicação da metodologia desenvolvida à avaliação da toxicidade de LIs

Neste trabalho, a atividade da GR foi avaliada na presença de sete LIs comerciais com o objetivo de prever a sua toxicidade de acordo com o ciclo analítico otimizado e recorrendo à estratégia otimizada de diluição. Os compostos selecionados apresentam diferentes estruturas químicas conferidas por diferentes elementos estruturais o que determina um comportamento específico para cada composto. O perfil de inibição para cada composto está representado na Figura 6.7 e os valores de EC_{50} calculados representados na Tabela 6.3.

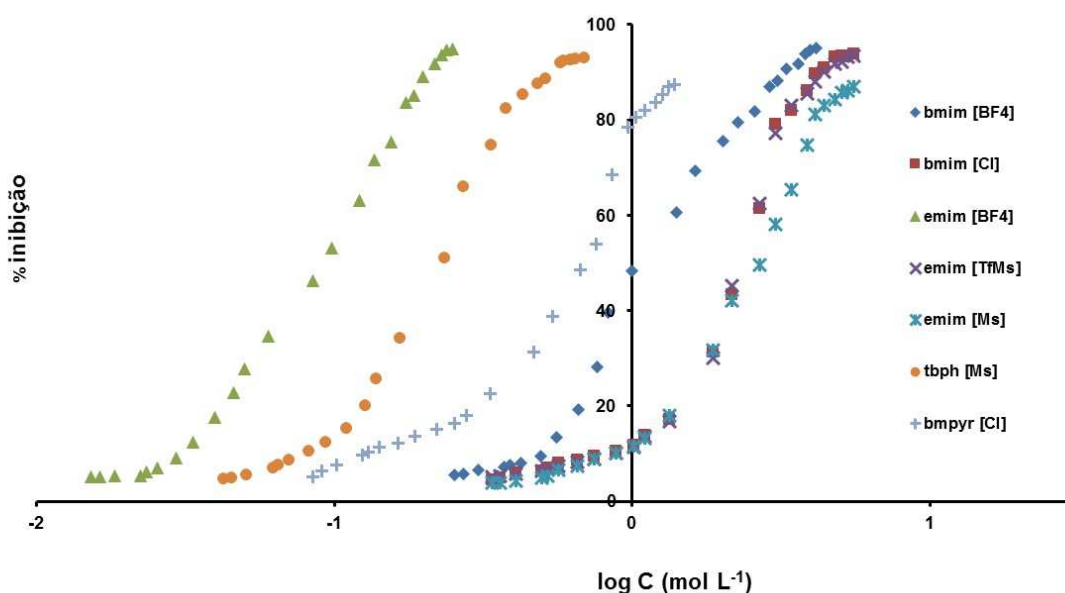


Figura 6.7 – Resultados dos ensaios de inibição enzimática.

Tabela 6.3 – Toxicidade dos inibidores estudados expressa como EC₅₀

LI	EC ₅₀ (M) ± DR*
bmim [BF ₄]	1,87 ± 0,08
bmim [Cl]	2,43 ± 0,71
emim [BF ₄]	0,09 ± 0,01
emim [TfMs]	2,20 ± 0,85
emim [Ms]	2,55 ± 0,93
bmpyr [Cl]	0,71 ± 0,06
tbph [Ms]	0,24 ± 0,03

*DR- desvio relativo de três réplicas.

Considerando os resultados obtidos, verifica-se que os LIs estudados apresentam um baixo efeito inibitório na GR, com valores de EC₅₀ entre 0,09 e 2,55 M. Estas concentrações são muito superiores às encontradas para esta e outras enzimas que exercem um papel protetor.

Os resultados obtidos referentes à inibição da GR pelos LIs estão de acordo com as tendências descritas na literatura referentes à influência dos grupos catiónicos e aniônicos. A avaliação do efeito do comprimento da cadeia alquílica lateral do catião não foi feita extensivamente neste trabalho e os resultados obtidos são contraditórios com os apresentados em vários trabalhos publicados. Estes resultados serão posteriormente discutidos tendo em consideração algumas propriedades dos LIs assim como características particulares da GR.

Para avaliar a influência do grupo catiónico na toxicidade dos LIs, foram selecionadas três estruturas principais: imidazólio, fosfónio e pirrolidínio. Foi observado que os LIs que contêm grupos pirrolidínios e fosfónios não aromáticos apresentam valores mais baixos de EC₅₀ (0,24 e 0,71 M, respetivamente) em relação aos que apresentam os grupos catiónicos aromáticos butil-imidazólio e etil-imidazólio e com o mesmo anião (bmim [Cl] = 2,43 M e emim [Ms] = 2,55 M). A natureza do grupo tetrabutílfosfónio, que apresenta uma estrutura quaternária semelhante aos surfactantes, justifica parcialmente a tendência observada. Esta estrutura peculiar resulta em comportamentos químicos e biológicos semelhantes aos apresentados pelos surfactantes catiónicos, uma das classes com maior toxicidade dos compostos quaternários. Em relação ao grupo pirrolidínio os resultados estão de acordo com o esperado pois este grupo é referido como potencialmente mais tóxico do que o imidazólio sempre que apresenta o mesmo anião.

O aumento da cadeia lateral alquílica de 2 para 4 carbonos, nos LIs emim [BF₄] e bmim [BF₄], resulta num decréscimo da inibição da enzima o que pode ser evidenciado pelo aumento do EC₅₀ de 0,09 M para 1,87 M. Esta tendência não está concordante com

resultados obtidos com organismos superiores nos quais um aumento do comprimento da cadeia lateral dos LIs imidazólicos conduz a um aumento da lipofilicidade, resultando num aumento de inibição ou toxicidade. No entanto, foram obtidos resultados semelhantes por alguns autores (14) e pelo nosso grupo na avaliação da influência destes dois LIs nas enzimas catalase e tripsina (5, 15).

Tal como referido anteriormente, a introdução de dois carbonos na cadeia lateral alquílica do modo a obter o bmim [BF₄] não provoca um suficiente aumento da lipofilicidade capaz de causar a mesma tendência dos LIs com cadeias alquílicas de 6 carbonos ou superiores. A lipofilicidade destes dois LIs é relativamente baixa e desta forma a inibição enzimática está provavelmente associada a outros fatores. Para avaliar outras causas é necessário ter em consideração a estrutura peculiar da GR.

Esta enzima é uma redutase dissulfídrica dimérica cujo centro catalítico é formado a partir de resíduos provenientes de cinco domínios que estão organizados para formar duas bolsas hidrofóbicas que são as áreas de ligação da GSSG e NADPH.

É conhecido que essas bolsas estão cheias com solventes na ausência de substrato e cofator. Neste contexto, é altamente provável que o tamanho reduzido do catião emim facilite o acesso deste LI ao local ativo da enzima dando origem a uma competição com as moléculas de GSSG e NADPH, dificultando a sua entrada nas bolsas e a ligação ao local ativo. Estes factos poderão provocar uma diminuição da atividade da enzima quando comparada com o LI com o grupo bmim, que apresenta uma longa cadeia alquílica. O comportamento intrigante da enzima na presença de emim [BF₄], revelado pelo mais baixo EC₅₀ de todo o estudo é uma combinação deste efeito com o provocado pela presença do anião BF₄⁻, que será posteriormente discutido.

Para avaliar a toxicidade intrínseca dos aniões, foram selecionados quatro aniões vulgarmente usados neste tipo de compostos: tetrafluoroborato [BF₄⁻], cloreto [Cl⁻], trifluorometanosulfonato [TfMs⁻], e metanosulfonato [Ms⁻]. Neste estudo, assim como noutros, os aniões testados exibem um menor efeito na atividade da enzima quando comparado com os catiões estudados. No caso concreto, da comparação do comportamento da GR com emim [TfMs] e emim [Ms] evidencia que estes aniões influenciam de uma forma semelhante a atividade da enzima, pois apresentam valores de EC₅₀ muito próximos (2,20 e 2,55 M, respetivamente). Observando o anião BF₄⁻, apesar deste composto estar referido como não tendo influência na toxicidade dos LIs, neste estudo o seu efeito nocivo é bem evidente quando comparado com as concentrações inibitórias do emim [TfMs], emim [Ms] e emim [BF₄] com EC₅₀ de 2,2; 2,55 e 0,09 M, respetivamente. O mesmo efeito é observado com bmim [BF₄] e bmim [Cl] (1,87 e 2,43 M, respetivamente). Este efeito está descrito e poderá estar relacionado com a hidrólise

parcial do BF_4^- , que nas condições experimentais dará origem ao ácido hidrofúorídrico, um produto tóxico.

6.1.4. Conclusões

A avaliação da toxicidade dos LIs testados na atividade da GR, mostrou que a concentração dos inibidores é suficientemente alta tendo em consideração estes valores para uma possível contaminação humana ou ambiental.

Os resultados mostraram que o efeito da cadeia lateral nos LIs imidazólios provocou um aumento do EC_{50} , como se pode verificar pelos resultados do bmim $[\text{BF}_4]$ e emim $[\text{BF}_4]$, o que se deve, provavelmente a um impedimento estérico entre a enzima e o LI.

Os grupos aniónicos revelaram pouca influência no EC_{50} , tal como se pode verificar pela pouca diferença entre o EC_{50} do bmim $[\text{BF}_4]$ e bmim $[\text{Cl}]$.

Os LIs com grupos pirrolidínios e fosfónios mostraram efeito mais relevante na inibição enzimática por comparação com os LIs com grupos imidazólios.

6.1.5.Referências bibliográficas

1. Stock F, Hoffmann J, Ranke J, Stormann R, Ondruschka B, Jastorff B. Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase - a structure-activity relationship consideration. *Green Chemistry*. 2004;6(6):286-90.
2. Skladanowski AC, Stepnowski P, Kleszczynski K, Dmochowska B. AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics A potential molecular method for risk assessment of synthetic nitro- and polycyclic musks, imidazolium ionic liquids and N-glucopyranosyl ammonium salts. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2005;19(2):291-6.
3. Yu M, Li SM, Li XY, Zhang BJ, Wang JJ. Acute effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system of mouse liver. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2008;71(3):903-8.
4. Cunha E, Pinto PC, Carvalho JP, Saraiva ML. Automated carboxylesterase assay for the evaluation of ionic liquids' human toxicity. *J Hazard Mater*. 2013;244-245:563-9.
5. Pinto PC, Costa AD, Lima JL, Saraiva ML. Automated evaluation of the effect of ionic liquids on catalase activity. *Chemosphere*. 2011;82(11):1620-8.
6. Jastorff B, Molter K, Behrend P, Bottin-Weber U, Filser J, Heimers A, et al. Progress in evaluation of risk potential of ionic liquids-basis for an eco-design of sustainable products. *Green Chemistry*. 2005;7(5):362-72.
7. Paskova V, Hilscherova K, Feldmannova M, Blaha L. Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006;25(12):3238-45.
8. Paskova V, Paskerova H, Pikula J, Bandouchova H, Sedlackova J, Hilscherova K. Combined exposure of Japanese quails to cyanotoxins, Newcastle virus and lead: Oxidative stress responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2011;74(7):2082-90.
9. Roušar T, Pařík, P., Kučera, O., Bartoš, M. and Červinková, Z. Glutathione reductase is inhibited by acetaminophen-glutathione conjugate in vitro. *Physiol Res*. 2010;59:225-32.
10. Kumar M, Trivedi N, Reddy CR, Jha B. Toxic effects of imidazolium ionic liquids on the green seaweed *Ulva lactuca*: oxidative stress and DNA damage. *Chem Res Toxicol*. 2011;24(11):1882-90.
11. Araujo ARTS, Saraiva MLMFS, Lima JLFC. Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system. *Talanta*. 2008;74(5):1511-9.

12. Peña RM, Lima JLFC, Saraiva MLMFS. Sequential injection analysis-based flow system for the enzymatic determination of aspartame. *Analytica Chimica Acta*. 2004;514(1):37-43.
13. vanStanden JF MG. Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis. *Process Contr Qual*. 1992;3:251-61.
14. Kulacki KJ, Lamberti GA. Toxicity of imidazolium ionic liquids to freshwater algae. *Green Chemistry*. 2008;10(1):104-10.
15. Pinto PCAG, Costa SPF, Costa ADF, Passos ML, Lima JLFC, Saraiva MLMFS. Trypsin activity in imidazolium based ionic liquids: evaluation of free and immobilized enzyme. *Journal of Molecular Liquids*. 2012;171:16-22.

CAPÍTULO 7

Conclusões gerais

7.1. Conclusões gerais

O desenvolvimento a aplicação das montagens apresentadas, permitiram confirmar a elevada versatilidade e robustez da técnica SIA, que esteve na base de todas as metodologias. A utilização da válvula seletora, como elemento central dos sistemas desenvolvidos, permitiu a incorporação de diversos dispositivos, que aumentaram as potencialidades analíticas das montagens, sem aumentar de uma forma significativa a sua complexidade.

A metodologia SIA desenvolvida para a avaliação da toxicidade humana dos LIs, através do estudo da alteração da atividade da carboxilesterase humana 2 mostrou ser rápida, simples e robusta. Foi otimizada em meio aquoso e na presença de concentrações crescentes de sete LIs comerciais e de bis(p-nitrofenil) fosfato de sódio, um forte inibidor da carboxilesterase. O efeito da inibição foi quantificado através da concentração que induzia metade do efeito máximo (EC_{50}) e os resultados obtidos estavam compreendidos entre 38 e 134 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os compostos que apresentaram uma menor toxicidade e os que apresentaram uma maior toxicidade neste estudo foram o emim [Ms] e o Tbph [Ms], respetivamente. A automatização recorrendo a um sistema SIA confirmou as vantagens da associação de um procedimento enzimático a esta técnica de fluxo, permitiu um controlo rigoroso das condições da reação (tempo, temperatura) o que se traduziu na maximização da atividade enzimática. Além disso, a metodologia permitiu um controlo rigoroso dos volumes aspirados o que resultou na rentabilização do tempo de análise e numa produção reduzida de efluentes tóxicos (apenas 2 ml por ciclo). Isto é particularmente importante dado o desconhecimento do efeito a longo prazo para a saúde humana e para o ambiente dos LI. Além disso, o método automático desenvolvido obriga a uma intervenção mínima do operador, o que resulta num aumento de segurança para o mesmo.

O sistema desenvolvido para avaliar a atividade da enzima α -quimiotripsina em meio micelar misto, permitiu evidenciar as potencialidades deste meio reacional em biocatálise. As micelas mistas eram constituídas por CTAB e quatro LIs, hmim [CI], bmim [CI], bmpyr [CI] e bmpy [CI]. O LI que apresentou melhor eficiência catalítica foi o bmpy [CI]. A utilização de surfactante/LI na preparação das micelas mistas mostrou estar de acordo com os princípios da Química Verde, 'dado que a substituição de solventes orgânicos tóxicos leva a uma redução da toxicidade assim como garante um aumento da atividade e seletividade da enzima.

O controlo preciso das condições reacionais com a metodologia SIA, garantindo a reprodutibilidade dos períodos de tempo de envio para o detetor e de monitorização do sinal analítico, assim como a determinação dos parâmetros cinéticos (K_M^{ap} e V_{max}^{ap}).

O desenvolvimento da metodologia SIA para avaliar a utilização de LI como alternativa aos solventes orgânicos na atividade da enzima aldolase. A atividade enzimática foi avaliada em meio aquoso e na presença de dimetilformamida, metanol, bmpyr [Cl], hmim [Cl], bmim [BF₄], emim [BF₄], emim [Ac], bmim [Cl], emim [TfMs], emim [Ms] e Chol [Ac], com concentrações de 5%, 20% e 50%. O desenvolvimento da metodologia foi possível com a incorporação de uma câmara de mistura no sistema. A ação mecânica exercida pela movimentação da barra magnética e o período de paragem de escoamento permitiram a mistura efetiva das diferentes soluções bem como a criação de condições favoráveis ao desenvolvimento da reação catalítica selecionada. O posicionamento da câmara de mistura numa entrada lateral da válvula, facilitou a otimização do volume de envio para o detetor e permitiu controlar a limpeza da própria câmara, evitando contaminações do canal principal.

O LI que apresentou menor toxicidade foi o cho [Ac], que provou uma diminuição da atividade da enzima de apenas 2,7% quando utilizado com uma concentração de 50%. De um modo geral, os LI com o grupo colina ou grupos imidazólios, com cadeias alquílicas pequenas, associados a aniões biocompatíveis apresentam-se como LI muito promissores numa inclusão futura destes solventes em protocolos de síntese catalisados pela enzima aldolase.

Na automatização da avaliação da atividade da enzima glutathione redutase (GR), o modo de funcionamento da válvula seletora de fluídos, elemento central dos sistemas SIA desenvolvidos, tornou possível a implementação de um procedimento de diluição em linha, através da colocação de um tubo de diluição numa das portas da válvula, o que permitiu a análise de uma gama alargada de concentrações de LIs, confirmando mais uma vez as vantagens deste tipo de técnica na gestão de soluções. Nesta metodologia foi utilizado um reator enzimático, que apresentou como vantagens a redução de custos de análise, aumento do ritmo de amostragem e da precisão. A metodologia SIA desenvolvida mostrou ter como vantagem a reutilização de reagentes em suportes sólidos e a produção de um efluente inferior a 2 ml.

Nos ensaios de inibição da atividade da carboxilesterase e da glutathione redutase, os LIs com grupos pirrolidínios e fosfónios mostraram um efeito mais relevante na inibição enzimática por comparação com os LIs com grupos imidazólios. Foram obtidos valores de EC₅₀ entre 0,24 e 2,55 M para os compostos testados, o que revelou efeitos inibitórios distintos. O composto que revelou menor toxicidade e o que revelou maior toxicidade entre os compostos estudados foram o emim [Ms] e o emim [BF₄], respetivamente.

De um modo geral, os sistemas desenvolvidos apresentaram vantagens em termos de segurança humana e ambiental, uma intervenção limitada do operador, um consumo reduzido de enzima e LIs bem como a produção de pequenas quantidades de efluente.

Os trabalhos desenvolvidos demonstraram as vantagens da associação das enzimas com a metodologia SIA. Para cada situação analítica, foram otimizadas as condições de operação para as diferentes enzimas utilizadas, que incluiu a escolha do meio reacional mais conveniente, que permitisse a execução dos ensaios enzimáticos com elevado grau de reprodutibilidade e precisão. Da associação da biocatálise com a metodologia SIA foram ampliados os campos de aplicação, para além do meio aquoso. Assim, a biocatálise foi explorada em meios mistos, que envolveram além da água, solventes orgânicos, LIs e surfactantes.